

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLAB – Blida 1



Faculté des Sciences de a Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème :

**Caractérisation moléculaire de cestodes parasites du
céphalopode *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1798) du
littoral algérois**

Présenté par :

*AISSA Chaima

Date de la soutenance : 15/07/2021

* LAITOUTI Dounia

Devant le jury :

Nom	Grade	Lieu	Qualité
M ^r MOHAMED SAID.R	MCA	USDB	Président
M ^{me} CHALLAL. N	MCB	USDB	Examinatrice
M ^r BENYAHIA. N	MAA	USDB	Promoteur
M ^{me} AISSANI. R	MCB	USDB	Co-promotrice

Promotion: 2020 – 2021

Remerciements

C'est avec une profonde gratitude et un grand respect que nous commencerons par remercier notre promoteur Monsieur BENYAHIA sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Les mots les plus distingués et les phrases les plus respectueuses ne peuvent exprimer notre profond respect pour lui. Un grand merci pour son soutien, sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.

On adresse nos sincères remerciements à notre Co-promotrice Madame AISSANI pour tout ce qu'elle nous a apporté et pour ses précieux conseils qui ont beaucoup aidés dans notre mémoire.

On tient à témoigner toute notre reconnaissance à Monsieur MOHAMED SAID d'abord pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider ce jury mais aussi pour le partage de son savoir au cours de notre parcours universitaire et de nous avoir inspiré par sa passion pour les sciences. Nous vous remercions pour vos conseils judicieux qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre gratitude à Madame CHALLAL pour avoir accepté d'examiner notre travail et de faire partie du jury.

Nos remerciements s'adressent également à toute l'équipe pédagogique du département de BPC, merci à ceux qui nous ont enseignés au cours de ces cinq ans d'études et qui nous ont aussi préparés pour affronter la suite.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers :

*Ma première pensée est à ceux qui méritent le plus, ceux qui n'ont ménagé aucun effort pour que je puisse arriver à mes buts, ceux qui ont veillés tout au long de ces années pour me voir réussir, ceux grâce à qui je suis là aujourd'hui : **A mes très chers parents.***

***A mes très chères sœurs** Anfal et Besmala et mon frère Salah Eddine auxquels je souhaite un parcours universitaire aussi parfait que le mien.*

***A ma grand-mère maternelle,** mon oncle maternel Amine, mon oncle paternel Karim et son épouse, mes tantes maternelles et paternelles, que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

***A toutes mes cousines,** ma voisine Khadidja, et les amies que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour votre amour et votre encouragement.*

*Ainsi qu'à **mon binôme Dounia,** avec qui j'ai partagée des moments difficiles et d'autres agréables le long de ce travail.*

***A ma chère Rahil,** merci d'être cette amie généreuse et toujours disponible pour moi, je te souhaite tout le bonheur du monde ainsi que ta famille.*

*A Toutes les étudiantes de **l'option Génétique promotion 2021.***

***A la mémoire de mes grands-parents paternels,** ainsi que ma tante Nabila, que Dieu les accueille dans son vaste paradis.*

À tous ceux et celles qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce projet, Il me serait difficile de les citer tous, ils trouvent ici mes remerciements les plus sincères.

Chaima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

***A mes parents.** Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. **Ma chère mère** qui ne m'a jamais oublié dans ses prières, **mon cher père** qui ne m'a jamais laissé tomber. **MERCI** à tous les deux de m'avoir toujours soutenu et de m'avoir supporté pendant toute la durée de ce travail. Merci d'avoir sacrifié votre temps et même votre santé pour m'aider à arriver jusqu'ici.*

***A ma très chère sœur Lilia,** ma 2^{ème} mère, ma meilleure amie et mon mentor. Qui a joué un grand rôle dans mon éducation, qui était le phare qui m'a guidé dans ma vie et qui a contribué dans ce que je suis devenu aujourd'hui. All the words of thanks that exist cannot express my gratitude. So I'll just say **THANK YOU** for being everything I hope to be one day for her daughter Rym and for her son Yacine.*

***Ma tante adorée BELAIDI Saliha** qui n'a jamais oublié de m'adresser ses prières même aux fins fonds d'autres continents.*

***A mes frères** Nedhal, Nadjib, Samy et leurs petites familles.*

***A Mr BENYAHIA N.** Avec tout mon respect et ma gratitude, Merci de m'avoir donné une chance de travailler à vos côtés pour une période certes courte mais qui restera gravée dans ma mémoire pour toujours ; et pendant laquelle j'ai appris le vrai sens du terme « Chercheur ». Merci d'être mon mentor et de représenter le biologiste que j'espère devenir un jour.*

***A Mr MOHAMED SAID** et **a Mme GUESSAIBIA** qui m'ont fait aimer la Génétique dès les premières minutes du premier cours qu'ils m'ont enseigné.*

***A Chaima,** avec qui j'ai partagé des moments difficiles et d'autres agréables le long de ce travail.*

*A mes chers amis **Dania, Thanina, Sidali, Mohamed, Amina, sabrine** et **Chaima** qui ont fait de mes années passées dans cette université une période inoubliable remplie de bons souvenirs.*

A toutes mes chères sœurs de ma promo, les généticiennes de 2021. C'est un honneur d'avoir passé 3 ans remplis de beaux moments à leur côté.

Dounia

Résumé

Les informations sur le rôle des céphalopodes et particulièrement de la seiche *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, dans les cycles de vie des cestodes d'élasmobranches sont limitées. Aucun cycle de vie des cestodes marins n'a été déterminé à ce jour, du fait que les stades larvaires ne ressemblent pas à leurs adultes correspondants et sont donc difficiles à identifier morphologiquement. Cependant, les techniques moléculaires permettent de surmonter cette contrainte. Un échantillon composé de 8 larves plérocercoïdes de cestodes récoltées chez la seiche *Sepia officinalis*, d'une larve plérocercoïde obtenue chez le poulpe commun *Octopus vulgaris* et d'un cestode adulte provenant de l'intestin d'une raie *Raja asterias* ont été caractérisés moléculairement à partir d'une analyse des domaines D1-D3 et D2 de l'ADNr 28S, utilisés pour les identifications taxonomiques. Une analyse moléculaire préliminaire a montré que les 10 individus étaient répartis en 3 sous-ensembles caractérisés chacun par un segment d'ADN de taille variable pour le D1-D3, respectivement 1263 pb, 1289 pb et 1297 pb et de la même taille de 654pb pour le D2. Les résultats du BLAST de nos échantillons ont révélé une identité génétique élevée de plus de 99% sur le D1-D3 et de 100% sur le D2 avec des plérocercoïdes correspondants au genre *Acanthobothrium*. Des arbres phylogénétiques ont été reconstruits à partir du modèle du Maximum Likelihood. A notre connaissance, il s'agit d'un premier signalement du cestode *Acanthobothrium* Blanchard, 1848 chez *Sepia officinalis*. A la lumière de ces résultats, nous avons proposé deux cycles évolutifs partiels pour *Acanthobothrium* sp. En augmentant la taille des échantillons hôtes et parasites, en multipliant les marqueurs moléculaires et en diversifiant les techniques moléculaires, les résultats à venir seront plus exhaustifs.

Mots clés: *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), phylogénie, cestodes-céphalopodes, marqueurs moléculaires, ADNr 28S.

ملخص

المعلومات عن دور رأسيات الأرجل، ولا سيما الحبار *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) في دورات حياة الديدان الخيطية لصفحيات الخياشيم محدودة. لم يتم تحديد أي دورة حياة للديدان الخيطية البحرية حتى الآن، لأن اليرقات لا تشبه البالغين المناظرين لها وبالتالي يصعب تحديدها عن طريق الشكل. لكن، التقنيات الجزيئية تجعل من الممكن التغلب على هذا القيد. عينة مكونة من 8 يرقات من الديدان الحلزونية تم جمعها من الحبار *Sepia officinalis*، يرقة plerocercoid تم الحصول عليها من الأخطبوط الشائع *Octopus vulgaris* ودودة خيطية بالغة من أمعاء *Raja asterias* تم تمييزها جزيئياً من تحليل D1-D3 و D2 مجالات 28S rDNA، المستخدمة للتعريفات التصنيفية. أظهر التحليل الجزيئي الأولي أن الأفراد العشرة تم تقسيمهم إلى 3 مجموعات فرعية تتميز كل منها بقطعة DNA ذات حجم متغير لـ D1-D3، على التوالي 1263pb و 1289pb و 1297pb و بنفس الحجم 654pb في D2. كشفت نتائج BLAST لعيناتنا عن هوية وراثية عالية تزيد عن 99% في D1-D3 و 100% على D2 مع plerocercoids المقابلة لجنس *Acanthobothrium*. أعيد بناء أشجار النشوء والتطور من نموذج الاحتمالية القصوى (Maximum Likelihood). على حد علمنا، هذا هو التقرير الأول عن الديدان الخيطية *Acanthobothrium* (Blanchard, 1848) في *Sepia officinalis*. في ضوء هذه النتائج، اقترحنا دورتين من دورات الحياة الجزيئية لـ *Acanthobothrium sp*. من خلال زيادة حجم عينات المضيف والطفيلي، عن طريق مضاعفة العلامات الجزيئية وتنويع التقنيات الجزيئية، ستكون النتائج المستقبلية أكثر شمولاً.

الكلمات المفتاحية: الحبار الشائع، علم تطور السلالات، ديدان خيطية-رأسيات الأرجل، الواسمات الجزيئية،

ADNr 28S

Abstract

Information on the role of cephalopods, and in particular of the cuttlefish *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, in the life cycles of elasmobranch cestodes is limited. No life cycle of marine cestodes has been determined to date, as the larval stages do not resemble their corresponding adults and are therefore difficult to identify morphologically. However, molecular techniques make it possible to overcome this constraint. A sample composed of 8 pléroceroïd larvae of cestodes taken from cuttlefish *Sepia officinalis*, a pléroceroïd larva obtained from the common *Octopus vulgaris* and an adult cestode from the intestine of a ray *Raja asterias* were molecularly characterized by an analysis of D1-D3 and D2 domains of 28S rDNA, used for taxonomic identifications. A preliminary molecular analysis showed that the 10 individuals were divided into 3 subsets each characterized by a DNA segment of variable size for D1-D3, respectively 1263 bp, 1289 bp and 1297 bp and of the same size of 654 bp for D2. The BLAST results of our samples revealed a high genetic identity of more than 99% at D1-D3 and 100% at D2 with pléroceroïds corresponding to the genus *Acanthobothrium*. The phylogenetic trees were reconstructed from the maximum Likelihood model. To our knowledge, this is the first report of the cestode *Acanthobothrium* Blanchard, 1848 in *Sepia officinalis*. In light of these results, we have proposed two partial life cycles for *Acanthobothrium* sp. by increasing the size of host and parasite samples, multiplying molecular markers and diversifying molecular techniques, future results will be more comprehensive.

Key words: *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), phylogeny, cestodes-cephalopods, molecular markers, rDNA 28S.

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

Introduction1

I. Synthèse bibliographique

I.1. Céphalopodes3

I.1.1. Généralités3

I.1.2. Caractéristiques4

I.1.3. Distribution géographique et Bathymétrie5

I.2. *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1798)

I.2.1. Présentation de l'espèce6

I.2.2. Description7

I.2.3. Ecologie8

I.2.3.1. Distribution géographique8

I.2.3.2. Distribution Bathymétrie8

I.2.3.3. Facteurs écologiques9

I.2.3.4. Régime alimentaire10

I.2.4. *Sepia officinalis* dans les pêcheries.....11

I.3. Parasitisme12

I.3.1. Parasitisme chez les céphalopodes13

I.3.2. Cestodes13

I.4. Notions de phylogénie.....16

I.4.1. Généralités	16
I.4.2. Phylogénie moléculaire	17
I.4.3. Modèles et méthodes de la phylogénie moléculaire	18
II. Matériels et méthodes	
II.1. Matériel	22
II.1.1. Matériel biologique	22
II.1.2. Matériel non biologique	22
II.1.2.1. Matériel de laboratoire	22
II.1.2.2. Séquences nucléotidiques	23
II.1.2.3. Outils bioinformatiques	25
II.2. Méthodes	26
II.2.1. Prélèvement	26
II.2.2. Identification moléculaire	27
II.2.3. Analyse bioinformatique	28
II.2.3.1. BLAST	28
II.2.3.2. Alignement multiple avec ClustalW	28
II.2.3.3. Reconstruction de la phylogénie	29
III. Résultats	30
IV. Discussion	35
Conclusion	42
Références bibliographiques	44
Annexe	49

Liste des figures

Figure 1 : Biodiversité des céphalopodes du monde	3
Figure 2 : Répartition bathymétrique des céphalopodes	5
Figure 3 : Schéma représentant les caractères morphologique de <i>Sepia officinalis</i>	7
Figure 4 : Aire de distribution de <i>Sepia officinalis</i>	8
Figure 5 : Evolution des captures mondiales de seiche de <i>Sepia officinalis</i>	12
Figure 6 : Représentation schématique de l'anatomie des cestodes	14
Figure 7 : Les différentes représentations d'un arbre phylogénétique et les groupements possibles de taxons	17
Figure 8 : Représentation schématique du gène de l'ADNr 28S	18
Figure 9 : Représentation des valeurs du bootstrap sur un arbre phylogénétique	21
Figure 10 : Spécimens de <i>Sepia officinalis</i> pêchée au niveau d'Ain Tagourait, Wilaya de Tipaza	22
Figure 11 : Dissection des deux individus <i>Sepia officinalis</i>	26
Figure 12 : Organes internes de l'individu mâle de <i>Sepia officinalis</i>	27
Figure 13 : Larve de cestode (signalée par la tête de flèche noire) observée sous une loupe binoculaire au niveau de l'estomac d'un spécimen mâle de <i>Sepia officinalis</i>	27
Figure 14 : Workflow de l'identification moléculaire des parasites trouvés	28
Figure 15 : Arbre phylogénétique reconstituant les relations des larves de cestodes récoltées chez <i>Sepia officinalis</i> Linnaeus 1758 pêché dans les eaux du littoral algérois	33
Figure 16 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences D2 des cestodes récoltées chez <i>Sepia officinalis</i> , <i>Octopus vulgaris</i> et <i>Raja asterias</i> du littoral algérois ainsi que 24 séquences de Genbank	35
Figure 17 : Proposition de cycle évolutif pour <i>Acanthobothrium</i> sp dans les eaux algériennes.....	43
Figure 18 : Proposition de cycle évolutif pour <i>Acanthobothrium</i> sp dans les eaux algériennes.....	43
Figure 19 : Organisation générale des gènes ribosomiaux sur l'ADN eucaryote et représentation de l'emplacement du domaine D1-D3.....	54

Liste des tableaux

Tableau I : Les caractéristiques les plus communes de <i>Sepia officinalis</i>	6
Tableau II : position systématique de <i>Sepia officinalis</i>	6
Tableau III : Composition des proies de <i>Sepia officinalis</i>	10
Tableau III (suite) : Composition des proies de <i>Sepia officinalis</i>	11
Tableau IV : Taxons parasites infectant les céphalopodes	13
Tableau V : Nombre d'espèces valides de chaque ordre de cestodes et les principaux groupes vertébrés hôtes	15
Tableau VI : Caractéristique des algorithmes d'inférence les plus courants et les logiciels bioinformatiques les prenant en charge	19
Tableau VII : Comparaison des forces et faiblesses relatives des méthodes les plus courantes de reconstruction phylogénétique	20
Tableau VIII : Résultats du BLAST présentant les plus grandes similitudes génétiques.....	30
Tableau IX : Taxa obtenus de Genbank, inclus dans l'analyse phylogénétique	31
Tableau IX (suite) : Taxa obtenus de Genbank, inclus dans l'analyse phylogénétique.....	32
Tableau X : Liste des espèces <i>Acanthobothrium</i> trouvés chez des élasmobranches en méditerranée	39
Tableau XI : Elasmobranches du littoral algérien pouvant constituer des hôtes définitifs pour <i>Acanthobothrium</i>	40
Tableau XII : Espèces proies communes entre <i>Sepia officinalis</i> et <i>Octopus vulgaris</i> , chez lesquels des larves de cestodes ont été observés	41
Tableau XIII (annexe) : amorces utilisées pour les PCR avec indication du sens de la séquence et la référence	53

Glossaire :

- **Elasmobranches** : sous-classe de poissons cartilagineux comprenant les raies et les requins.
- **E-value** : le nombre total des alignements retrouvés dans d'autres banques de données, ayant un pourcentage d'identité supérieur à celui obtenu dans Genbank. plus la valeur est petite, plus l'alignement est fiable.
- **Forme FASTA** : est un format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences biologiques de nature nucléique ou protéique.
- **Genbank** : base de données de NCBI, regroupant une collection annotée de séquences génétiques accessibles au public.
- **Hôte intermédiaire** : est un hôte chez lequel le parasite va subir une évolution larvaire et/ou va effectuer sa reproduction.
- **Hôte Paraténique** : hôte facultatif chez lequel la forme du parasite reste à l'état dormant, sans obligation de réaliser le cycle en attendant d'être ingéré par l'hôte définitif.
- **Monophylie** : qualification d'un groupe taxonomique comprenant tous les descendants d'un individu.
- **Paraphylie** : qualification d'une lignée ne regroupant qu'une partie des tous les descendants d'un ancêtre.
- **Pléroceroïde** : Forme larvaire de certains parasites qui se développe dans divers organes de poissons ayant intégré des crustacés infestés par des larves procercoïdes.
- **Procercoïdes** : une forme larvaire des Cestodes Pseudophyllidiens.
- **Query cover** (couverture de requête) : valeur indiquant l'étendue de l'alignement de la séquence requête et la séquence trouvée dans Genbank.
- **Ressources halieutiques** : tous les animaux/ végétaux aquatiques exploités par l'homme.
- **Site informatif de parcimonie** : est une position dans l'ensemble pertinent de séquences qui donne des informations sur les relations évolutives entre les taxons.

Abréviation :

- **S. officinalis** : *Sepia officinalis*
- **Ra**: *Raja asterias*
- **OV**: *Octopus Vulgaris*
- **BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool
- **MEGA X**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version X
- **NCBI** : National Center For Biotechnology Information
- **MCMC**: Markov chain Monte Carlo
- **ML** : Maximum Likelihood (Maximum de vraisemblance)
- **MP** : Maximum parcimonie
- **NJ**: neighbour-joining
- **UPGMA**: Unweighted pair group method with arithmetic mean

Introduction

La moitié des espèces vivantes sur terre sont des espèces parasites et l'autre moitié leur sert d'hôtes. En effet, tous les organismes vivants hébergent des parasites (Guégan et al., 2012). La diversité de ces créatures est considérable, tant en espèces qu'en taille (de quelques microns à plusieurs mètres), cycle et mode de vie.

Pourtant, le parasitisme en milieu marin reste encore largement méconnu pour différentes raisons, tels l'immense étendue marine, la dispersion et la mobilité des espèces marines et la difficulté d'accès à certains environnements, tels les fonds marins (Poulin et al., 2016).

Les céphalopodes sont des hôtes importants dans la transmission et les cycles de vie de plus de 200 espèces parasites différentes (Pascual et al., 1996; Petrić et al., 2011; Roumbedakis et al., 2018). Ils constituent un environnement favorable pour les larves de nombreux parasites (Gonzalez et al., 2003), particulièrement les cestodes.

Cependant, les larves des parasites de la classe des cestoda sont difficiles à identifier avec précision en utilisant les critères morphologiques (Jensen et Bullard, 2010; Caira et al., 2020); La raison étant que les stades larvaires des cestodes ne ressemblent pas à leurs adultes, ce qui entraîne de nombreuses confusions et erreurs dans l'identification (Caira et Jensen, 2014). Par conséquent, aucun cycle de vie des cestodes marins n'a été déterminé à ce jour (Jensen et Bullard, 2010) et ceci a des implications pour la compréhension de leurs rôles dans les écosystèmes et leurs voies de transmission.

Néanmoins, le développement des techniques moléculaires a permis de résoudre le problème des identifications taxinomiques des larves de cestodes et d'offrir de nouvelles perspectives pour combler les lacunes sur leurs cycles de vie (H. S. Randhawa, 2011). Les travaux utilisant cette approche sur les parasites des céphalopodes n'ont cessés d'augmenter ces dernières années (Brickle et al., 2001; Holland & Wilson, 2009; Jensen & Bullard, 2010; Guardone et al., 2020; Tedesco et al., 2020), mais jusqu'à ce jour aucun n'a été réalisé sur la seiche commune *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, l'un des céphalopodes les plus commercialisés dans toute la mer Méditerranée.

En Algérie, les travaux sur la seiche commune (*S. officinalis*) sont très rares malgré son importance dans les pêcheries. Ils ne se sont intéressés qu'à la biologie, l'écologie et l'exploitation de cette espèce (Kennouche, 2017). L'aspect parasitologique est important à prendre en considération car il ne renseigne pas uniquement sur l'état des stocks et leur condition sanitaire, mais il peut

également servir à prévenir le risque d'infestation dû à des espèces potentiellement porteuses de zoonoses (le nématode *Anisakis* par exemple).

Dans le cadre de notre PFE, réalisé à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'USDB Blida 1, nous nous sommes donné comme objectifs :

- 1- la recherche et l'identification des parasites de la seiche *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758.
- 2- l'identification la plus précise possible des larves de cestodes à l'aide de marqueurs moléculaires (ADNr 28 S).
- 3- la détermination de cycles évolutifs des helminthes identifiés.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Céphalopodes

I.1.1. Généralités

Les céphalopodes sont une classe d'animaux carnassiers exclusivement marins et extrêmement diversifiée, appartenant à la famille des mollusques; cette classe contient plus de 800 espèces décrites (Sanchez et al., 2018). Les lignées toujours existantes sont subdivisées en deux sous-classes : Nautiloidea qui n'est représentée que par une poignée d'espèces récentes et Coleoidea qui est en évolution rapide et qui a divergée en deux super-ordres (les décapodiformes et les octopodiformes). Les céphalopodes coléoïdes contrairement aux nautiloïdes n'ont pas de coquille externe. Certains, comme les seiches (famille des Sepiidae), ont une coquille calcifiée interne ou un phragmocône ; tandis que pour d'autres, la coquille a été réduite à un glaive ou complètement perdue (Sanchez et *al.*, 2018).

Ces animaux sont considérés comme à la fois attrayants et énigmatiques, certains disent qu'ils ressemblent à des extraterrestres et d'autres trouvent que ces créatures qui fascinent les humains depuis des milliers d'années sont tout simplement des merveilles de la nature. Cela en raison de leurs formes corporelles, apparences colorées, capacités cognitives complexes et de leur étrangeté globale assez inhabituelle chez les animaux (**Figure 1**).



Figure 1. Biodiversité des céphalopodes du monde

I.1.2. Caractéristiques

Le mot " Céphalopode " dérive de l'union de deux mots grecs " képhalé " qui signifie « tête » et " podos " qui se traduit par « pied ». Ces mollusques ont une couronne d'appendices mobiles (bras ou tentacules) attachés directement à la tête et entourant la bouche, ainsi qu'une paire de mâchoires chitineuses (becs). entre les deux grands yeux situés de chaque côté de la tête, se trouve un grand cerveau qui peut avoir plus de 30 lobes distincts et 150 millions de minuscules cellules nerveuses (Hanlon et al., 2018).

En plus de cette forme originale, les adultes de ces créatures fascinantes présentent une grande variété de tailles corporelles. Certains sont énormes, tels que les calmars géants (*Architeuthis* et *Moroteuthis*) qui peuvent atteindre des longueurs totales de 20 m ou plus (Kinne, 1980) et certains sont très petits, moins de 1 cm (Jereb et Roper, 2005) telle que la pieuvre à anneaux bleus, très dangereuse malgré sa petite taille (quelques millimètres), car venimeuse.

Les céphalopodes présentent une grande diversité de couleurs, certains d'entre eux comme les poulpes, les calmars, les seiches et les nautilus sont parmi les plus beaux animaux de la planète. Ils sont considérés comme les caméléons de la mer en raison de l'une de leurs qualités très spéciale, connue sous le nom de coloration adaptative rapide (Hanlon et al., 2018), une des conséquences de la réduction de la coquille et l'exposition de la surface extérieure du manteau. Cette capacité à changer la structure de leur peau et leur apparence générale en une fraction de seconde est due au développement de photophores bioluminescents qui produisent des motifs colorés changeants ressemblant à des bijoux (Hanlon et al., 2018). Leur peau constitue donc la clé d'un large éventail de comportements adaptatifs : camouflage, alarme, menace, fuite devant les prédateurs et attraction des partenaires, mais aussi de communication aux niveaux intraspécifique et interspécifique.

En tant que prédateurs actifs et proies pour de nombreuses autres créatures marines, ces invertébrés à corps mou sont sans égal en termes de mobilité (Kinne, 1980), dotés d'une gamme complète d'organes sensoriels, d'un cerveau développé et de capacités cognitives complexes. De plus, la plupart des coléoïdes produisent un fluide sombre et visqueux, « l'encre », cette substance unique peut prendre la forme de l'animal ou d'un nuage aveuglant (Jereb et Roper, 2005) pour désorienter les prédateurs et masquer la manœuvre de fuite de ce fin stratège.

I.1.3. Distribution géographique et bathymétrique

Les céphalopodes vivent dans tous les océans du monde, de l'Arctique à l'Antarctique. Ils occupent une vaste variété d'habitats, des zones néritiques (eaux côtières peu profondes) aux zones océaniques, des zones épipelagique jusqu'aux profondeurs très froides de plus de 5000 m (**Figure 2**) et même sous la glace dans les mers polaires. Mais aucun de ces mollusques n'est présent dans l'eau douce, et seuls quelques-uns peuvent tolérer des salinités légèrement inférieures à celles des eaux océanique (Hanlon et al., 2018).

Ces dernières années des changements de distribution et une prolifération mondiale des céphalopodes ont été signalés, qui pourraient être attribués à leur forte plasticité phénotypique. Ce qui met en évidence la capacité de ces espèces à élargir leur distribution, suggérant ainsi une future extension de leur aire de répartition (Schickele et al., 2021).

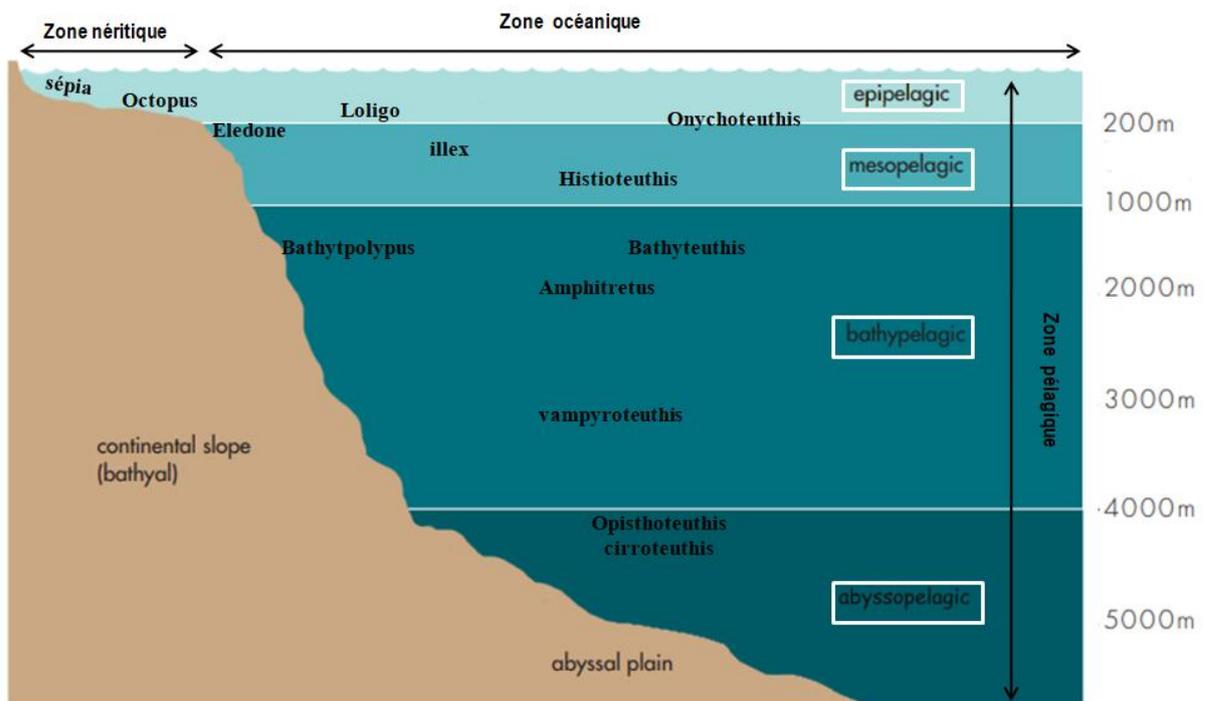


Figure 2. Répartition bathymétrique des céphalopodes (Hanlon et al., 2018 ; Gestal et al., 2019, modifié)

I.2. *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758)

I.2.1. Présentation de l'espèce

Sepia officinalis (Linnaeus, 1758), est une espèce de céphalopode appartenant à l'ordre des Sepiida (**Tableau II**). Cet animal extrêmement intelligent, doté de capacités à la fois stupéfiantes et intrigantes (**Tableau I**), est parmi les créatures marines les plus appréciées et étudiées au monde. Ce qui lui a permis d'être connu sous plusieurs noms et pour certaines caractéristiques qui sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau I. Caractéristiques les plus communes de *Sepia officinalis*

Noms	commun	Seiche commune
	Locaux	Sepia ; seiche ; choubei
	Synonymes	<i>Sepia filliouxii</i> (Lafont, 1869) ; <i>Sepia mediterranea</i> (Ninni, 1884)
Capacités	Camouflage adaptatif	Ce virtuose de l'imitation est capable de changer instantanément de couleur pour se fondre dans son environnement.
	Jet d'encre	La seiche se sentant en danger, adopte une stratégie pour se protéger ; une substance noire projetée enveloppe le prédateur qui se retrouve dans l'obscurité. Une fois le nuage noir dissipé, nulle trace de la seiche.

La position systématique de la seiche commune est la suivante :

Tableau II. Position systématique de *Sepia officinalis*

Règne	Animal
Embranchement	Mollusques
Classe	Cephalopoda Cuvier, 1797
Sous-classe	Coleoidea Bather, 1888
Superordre	Decapodiformes Young et al. 1998
Ordre	Sepiida Naef, 1817
Famille	Sepiidae Keferstein, 1866
genre	<i>Sepia</i> Linnaeus, 1758
Espèce	<i>officinalis</i> Linnaeus, 1758

I.2.2. Description

La seiche commune possède huit bras courts et deux tentacules longs (bras préhensiles qui peuvent être invaginés dans une poche spéciale et brusquement projetés pour la capture des proies) munis de ventouses qui ne sont pas seulement des organes de préhension mais contiennent également des cellules sensorielles pour le toucher et le goût (Hanlon et *al.*, 2018). Ces dix bras forment une couronne entourant la bouche et deux yeux volumineux qui ont des pupilles en forme de «W». Les mâles se distinguent par le bras ventral gauche (bras hectocotyle) qui est un organe de copulation (**Figure 3**).

Le reste du corps est constitué d'un manteau (pallium) ovoïde aplati dorsoventralement bordé par deux nageoires latérales larges dont les mouvements ondulatoires permettent à la seiche de se déplacer ou de maintenir sa stabilité. Le repli du manteau forme la cavité palléale qui est accessible depuis une fente fermée de part et d'autre par des boutons de pression et qui se situe à la limite postérieure de la tête; cette dernière est surmontée d'un entonnoir (**Figure 3**) qui permet d'aspirer l'eau puis de l'expulser avec force, propulsant ainsi la seiche rapidement au loin. Le manteau de *S. officinalis* peut atteindre jusqu'à 49 cm de longueur au maximum (Jereb et Roper, 2005), mais les individus de 15 à 25 cm sont plus communs. Il est fortement pigmenté surtout sur la face dorsale qui est caractérisée par un motif fait de rayures zébrées ou marbrées de blanc et de brun, variant en fonction de l'environnement et des situations. Cette face est plus rigide, en raison de la présence du sépion (os de seiche) qui est une coquille calcaire. Le sépion régule la flottabilité des seiches, de sorte qu'elles peuvent planer à n'importe quelle profondeur (Hanlon et *al.*, 2018).

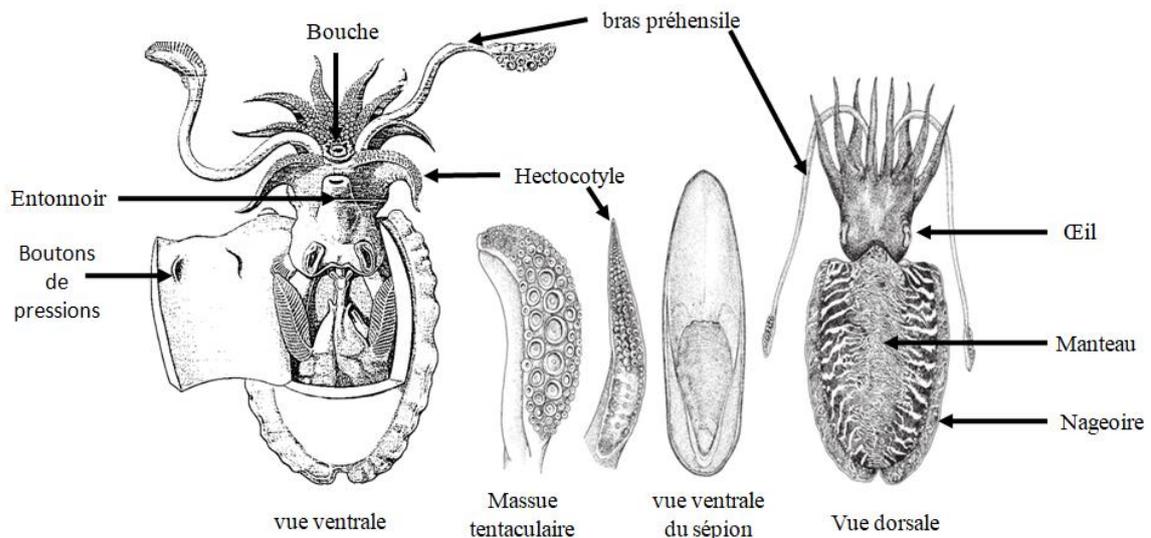


Figure 3. Schéma représentant les caractères morphologique de *Sepia officinalis* (Pfurtscheller, 1905; Jereb & Roper, 2005 modifié)

I.2.3. Ecologie

I.2.3.1. Distribution géographique

L'aire de répartition de *S. officinalis* couvre toute la mer Méditerranée (bassin occidental, mer Adriatique, mer Ionienne, mer Égée et bassin Levantin). Elle s'étend de l'Atlantique Nord-Est, depuis la côte irlandaise et les côtes orientales et occidentales de l'Écosse, jusqu'aux côtes Nord-Ouest de l'Afrique, à la frontière entre la Mauritanie et le Sénégal. Elle est également présente dans les régions centrale et méridionale de la mer du Nord, ainsi que dans la Manche (Jereb et Roper, 2005; Jereb et al., 2015; Hanlon et al., 2018; Seraphin et al., 2019) (**Figure 4**).

Des découvertes sporadiques ont été faites autour des îles Féroé, au sud des îles Shetland et sur les côtes ouest de la Norvège jusqu'à Trondheim. Cependant, ces relevés nordiques sont probablement dus à des incursions occasionnelles dans les eaux de l'Atlantique. (Jereb *et al.*, 2015; Seraphin *et al.*, 2019)

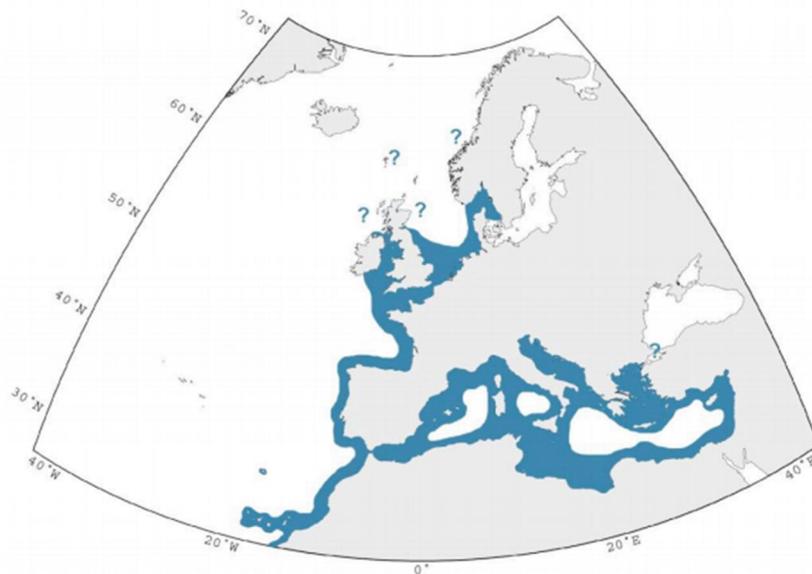


Figure 4. Aire de distribution de *Sepia officinalis* (Jereb et al., 2015)

I.2.3.2. Distribution Bathymétrique

La seiche *S. officinalis* est une espèce néritique, démersale ou nectobenthique, c'est-à-dire qu'elle a tendance à vivre près ou sur le fond du plateau continental. La morphologie de la coquille limite sa gamme de profondeur du littoral (2 à 3 m de profondeur) jusqu'à environ 200 m; elle est plus abondante dans les 100 m supérieurs (Jereb et al., 2015). Ces espèces du camouflage préfèrent les fonds sableux et vaseux couverts d'algues et de graminées marines, car elles peuvent

mieux s'y dissimuler. La plupart des individus passent la journée enfouis dans le sable et ne deviennent actifs qu'à la tombée de la nuit en se mettant à la recherche de leurs proies.

Cet animal au comportement grégaire subit des migrations saisonnières en rapport avec la reproduction. Les gros individus migrent des eaux plus profondes au début du printemps vers les eaux côtières, les mâles précédant les femelles. Ce groupe est suivi des arrivées successives d'animaux plus petits tout au long de l'été (Jereb et Roper, 2005). Après l'accouplement, la ponte, l'éclosion ainsi que la mort des géniteurs, les juvéniles demeurent près de la côte pendant les mois d'été à proximité des frayères et regagnent les zones d'hivernage plus au large en automne.

I.2.3.3. Facteurs écologiques

La vie dans les eaux côtières expose cette espèce à des conditions hydrologiquement instables, et de ce fait, *S. officinalis* est apparemment capable de supporter des environnements changeants, non seulement pendant sa phase adulte, mais également au début du stade juvénile. Elle est relativement tolérante aux variations de salinité, contrairement à beaucoup d'autres céphalopodes. Des spécimens ont été observés en Méditerranée dans des lagunes côtières à une salinité de 27 PSU (Jereb et al., 2015) et des études ont montré que les jeunes et les adultes peuvent survivre pendant un certain temps à des salinités de 18 ± 2 PSU si ils s'acclimataient lentement. Cependant, d'autres études réalisées sur des œufs collectés dans le sud-ouest des Pays-Bas ont montré qu'en dessous de 22,4 PSU, les embryons présentent des malformations morphologiques (Jereb et al., 2015).

De plus, la tolérance thermique de la seiche commune est limitée entre 10 et 30 °C; en dehors de cette limite elles ne se nourrissent plus, restent inactives et meurent en quelques jours. Cela peut s'expliquer par la diminution de la concentration en oxygène dans l'eau (à des températures au-dessus de la limite supérieure), et de l'affinité de cette espèce pour l'oxygène (à des températures <10 °C).

Les expériences de Ward et Boletzky (1984) menées sur *S. officinalis*, ont montré qu'elle ne peut descendre qu'à des profondeurs où la pression atmosphérique est inférieure à la résistance mécanique de la coquille remplie de gaz qui, au-delà, implose. Les sépions de gros spécimens implosent entre 150 et 200 m, tandis que les embryons à un stade avancé de développement et les animaux nouvellement éclos implosent entre 50 et 100 m.

I.2.3.4. Régime alimentaire

S. officinalis en tant que prédateur actif et vorace, a une large gamme de régimes alimentaires. Les proies préférentielles de cet opportuniste trophique sont les crustacés et les petits poissons osseux (**Tableau III**); les mollusques, les polychètes et les vers némertiens sont des proies secondaires ou accidentelles.

La taille de ces animaux carnassiers joue un rôle dans leur alimentation. Étant donné que les nouveaux nés sont des adultes en miniature, ils commencent à chasser dès leur premier ou deuxième jour mais ne s’attaquent qu’à de petites proies. Les amphipodes, les mysidacés, les crevettes et d’autres petits crustacés, qui pullulent généralement dans de grands bancs justes au-dessus du fond, constituent le repas préféré de ces jeunes seiches (Jereb et al., 2015). Les grands spécimens quant à eux ne s’arrêtent pas aux petites proies citées auparavant, ils s’attaquent également à des proies relativement grandes et même aux petits de leur propre espèce (**Tableau III**). Les cas de cannibalisme chez *S. officinalis* ne sont pas rare et débutent au stade juvénile (Jereb et al., 2015).

Tableau III : Composition des proies de *Sepia officinalis*
(Castro et Guerra, 1990; Jereb et al., 2015)

	Taxon	Espèces proies
Osteichthyes	Ammodytidae	<i>Ammodytесто bianus</i>
	Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>
	Atherinidae	<i>Atherina presbyter</i>
	Belonidae	<i>Belone belone</i>
	Bothidae	<i>Arnoglossus laterna</i>
	Callionymidae	<i>Callionymus lyra</i>
	Carangidae	<i>Trachurus trachurus</i>
	Clupeidae	<i>Sardina pilchardus</i>
	Gadidae	<i>Trisopterus luscus</i>
	Gobiidae	<i>Aphia minuta, Deltentosteus quadrimaculatus, Gobius niger, G. paganellus, Lesueurigobius friesii, Pomatoschistus minutus, P. pictus, Pomatoschistus</i>
	Gobiesocidae	<i>Lepadogaster</i>
	Labridae	<i>Symphodus</i>
	Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	Mullidae	<i>Mulluss urmuletus</i>
	Soleidae	<i>Buglossidium luteum</i>
	Sparidae	<i>Spondyliosoma cantharus</i>
Syngnathidae	<i>Syngnathusacus, S. typhle</i>	
Trachinidae	<i>Echiichthys vipera</i>	

Tableau III (suite). Composition des proies de *Sepia officinalis* (Castro et Guerra, 1990; Jereb et al., 2015)

	Taxon	Espèces proies
Crustacés	Amphipoda	<i>Ampelisca brevicornis</i> , <i>A. spinipes</i> , <i>Caprelloidea</i> indet, <i>Dexamine spinosa</i> , <i>Echinogammarus marinus</i> , <i>Phthisica marina</i> , <i>Gammaridea</i> indet.
	Mysida	<i>Mesopodopsiss labberi</i>
	Decapoda Penaeioidea Astacide Anomura Brachyura Caridea	<i>Astecus leptodactylus</i> , <i>Pagurus bernhardus</i> , <i>Pisidia longicornis</i> , <i>Porcelana platycheles</i> , <i>Crangon crangon</i> , <i>Crangonidae</i> indet, <i>Palaemon adspersus</i> , <i>P. serratus</i> , <i>Philoche asfasciatus</i> , <i>Processa edulis</i> , <i>Asthenognathus atlanticus</i> , <i>Atelecyclus undecimdentatus</i> , <i>Carcinus maenas</i> , <i>Liocarcinus corrugatus</i> , <i>L. depurator</i> , <i>L. marmoreus</i> , <i>L. navigator</i> , <i>Necorapuber</i> , <i>Pilumnus spinifer</i> , <i>Macropodia rostrata</i> , <i>Maja squinado</i> , <i>Polybius henslowi</i> , <i>Macropipus tuberculatus</i> (ou <i>M. vernalis</i>), <i>Dorippe lanata</i> .
Mollusques	Gastropoda Haliotididae Trochidae Patellidae	<i>Haliotis tuberculata</i> <i>Patella vulgata</i>
	Céphalopoda: Sepiidae	<i>Sepia elegans</i> , <i>S. officinalis</i>
	Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i> , <i>Polititapes virgineus</i>
Vers	Polychaeta	<i>Marphysa spp.</i>
	Nemertea	Indéterminé

1.2.4. *Sepia officinalis* dans les pêcheries

S. officinalis est considérée parmi les ressources halieutique majeures et l'une des espèces les plus importantes pour la pêche aux céphalopodes dans de nombreux pays, tant en Méditerranée que dans les eaux atlantiques. Les captures mondiales de cette espèce ont augmenté ces dernières années (**Figure 5**), Elles sont passées de 3 700 tonnes en 1950 à environ 22 604 tonnes en 2016 (FAO, 2021). Les débarquements les plus importants sont enregistrées en Italie, France et Tunisie en Méditerranée et au large de l'Afrique de l'Ouest par les flottes marocaines et espagnoles. Cette dernière a réalisé les plus grosses prises pendant de nombreuses années (Jereb et Roper, 2005).

En Algérie, les prises commerciales se font par le chalut benthique à deux faces en tant que prise accessoire avec les poissons démersaux. La pêche artisanale se fait par la pratique de certaines

techniques saisonnières telles que le trémail, la turlute (en barque ou à partir d'un quai) et la méthode dite « à la femelle », qui se pratique pendant la saison de reproduction et consiste à laisser une femelle à la traine du bateau, au bout d'une corde assez courte. Les mâles attirés par l'odeur, viennent en grand nombre et la capture se fait à l'épuisette (Kennouche, 2017).

La seiche commune est généralement commercialisée fraîche ou congelée tout au long de l'année et constitue un aliment très apprécié. Mais malheureusement les informations disponibles sur la pêche des seiches dans les eaux algériennes sont insuffisantes pour évaluer l'état du stock et son exploitation.



Figure 5. Evolution des captures mondiales de seiche de *Sepia officinalis* (FAO, 2021)

I.3. Parasitisme

Le parasitisme est défini comme une association étroite de deux organismes non apparentés, dans lesquels l'un (le parasite) dépend de l'autre (l'hôte) pour un certain bénéfice (Klaus, 2005). Cet avantage est souvent la nutrition, le transport et la protection, mais l'hôte permet également le développement et la survie des différents stades du parasite ou de sa reproduction (Klimpel et al., 2019). Ce processus affecte l'hôte de différentes manières (anémie, carence alimentaire, intoxication, altération des fonctions organiques vitales, infections secondaires par microorganismes pathogènes...) générant ainsi une pression de sélection et d'adaptation (Guégan et al., 2012). Pour cela, les parasites peuvent être caractérisés comme une force motrice de la diversité génétique et l'évolution de leurs organismes hôtes (Klimpel et al., 2019).

Les cycles de vie des parasites peuvent être directs, impliquant un seul hôte, ou indirects, dans lequel plusieurs hôtes sont nécessaires : un hôte définitif hébergeant le stade sexuellement mature du parasite et au moins un hôte intermédiaire abritant des stades immatures et en développement.

Les hôtes paraténiques quant à eux, ne sont pas forcément nécessaires à la survie du parasite mais servent de moyen de transport pour les formes larvaires (Klaus, 2005; Klimpel et al., 2019) et permettent de combler les écarts écologiques trophiques et temporels entre les hôtes intermédiaires et définitifs, sans s'engager dans le développement du parasite. Cela permet au stade infectieux de persister dans l'environnement pendant de plus longues périodes, augmentant le risque d'ingestion par l'hôte suivant (Petrić et al., 2011).

I.3.1. Parasitisme chez les céphalopodes

Les céphalopodes, avec leur rôle crucial dans les réseaux trophiques marins, sont des hôtes importants dans la transmission et les cycles de vie de plus de 200 espèces parasites différentes (Pascual et al., 1996; Petrić et al., 2011; Roumbedakis et al., 2018). Ils peuvent être des hôtes définitifs pour les protistes, les dicyémidés, les monogènes et les crustacés, ainsi que des hôtes intermédiaires ou paraténiques pour les trématodes digènes, les cestodes et les nématodes (**Tableau IV**) (Roumbedakis et al., 2018). Presque toutes les espèces exploitées connues de céphalopodes abritent des parasites et *S. officinalis* ne fait pas exception ; divers parasites protistes coccidies, microsporidies et ciliates, les mésozoaires dicyemides, et les métazoaires tels les trématodes digènes, les cestodes, les nématodes, les brachyurans, les copépodes et les isopodes, sont connus chez les juvéniles et les adultes de cette espèce (Jereb et al., 2015).

Tableau IV : Taxons parasites infectant les céphalopodes (Roumbedakis et al., 2018)

	Nautilida	Spirulida	Spiida	Myopsida	Oegopsida	Octopoda	Vampyromorpha
Protozoa					• (1)		
Chromista		• (1)	• (7)	• (2)	• (11)	• (9)	
Dicyemida			• (31)	• (5)		• (59)	
Monogenea				• (2)			
Digenea			• (2)	• (3)	• (2)	• (3)	
Cestoda			• (6)	• (9)	• (18)	• (2)	
Acanthocephala					• (1)		
Nematoda			• (3)	• (3)	• (16)		
Annelida				• (4)		• (4)	
Crustacea	• (1)		• (5)	• (5)	• (4)	• (13)	

I.3.2. Cestodes

Les cestodes sont des plathelminthes exclusivement endoparasites, infectant les poissons osseux, les oiseaux, les mammifères, les amphibiens et les élasmobranches comme hôtes vertébrés définitifs (**Tableau V**) ; les téléostéens, les mollusques, les crustacés et les mammifères marins

sont considérés comme hôtes intermédiaires/paraténiques, car ils accumulent souvent une série de stades larvaires (Jensen et Bullard, 2010; Bennett et al., 2019).

Ces parasites hermaphrodites sont formés de trois régions corporelles distinctes : le scolex (organe de fixation armé de crochets et/ou équipé de ventouses), le cou et un strobile aplati, segmenté et composé de proglottis individuels abritant un ou plusieurs ensembles d'organes reproducteurs mâles et femelles (**Figure 6**). Ils peuvent atteindre une longueur considérable de plusieurs mètres et produire en continu des proglottis (segments contenant les œufs) qui grossissent vers la fin du corps où ils atteignent également un stade de maturité plus développé et sont finalement excrétés avec les déjections de l'hôte (Klimpel et al., 2019). Etant donné qu'ils n'ont pas de système digestif, les cestodes doivent se fixer au tube digestif (ou occasionnellement ses organes associés) pour absorber les nutriments directement par leur néoderme. Une fois ancrés à la paroi intestinale de l'hôte, ils restent stationnaires pour le reste de leur durée de vie.

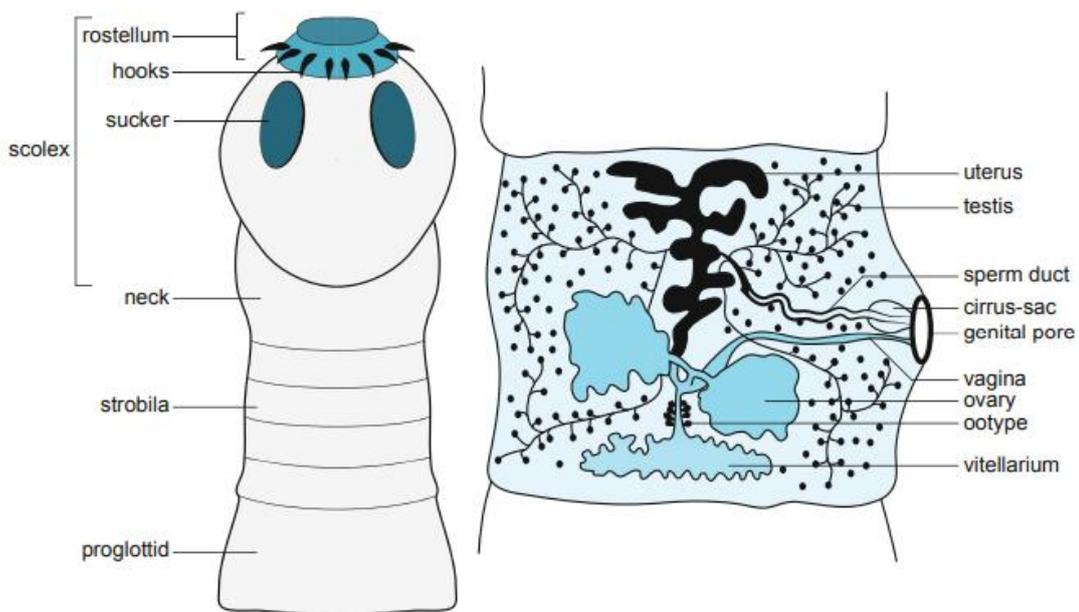


Figure 6. Représentation schématique de l'anatomie des cestodes (Klimpel et al., 2019)

La classe des cestoda est très répandue dans le monde, elle est constituée de deux sous-classes : les Cestodaria composés de deux ordres (Amphilinidea et Gyrocotylidea) et les Eucestoda qui regroupe tous les autres ordres des cestodes. Bien que de nombreux travaux ont permis une meilleure connaissance de la diversité des cestodes, leur distribution géographique, leurs association avec leurs hôtes, leurs systématique, certains points restent encore à élucider et à clarifier (Olson et al., 2001; Caira et al., 2014). Le plus notable est le statut des cestodes hébergés

par les élasmobranches (requins, raies et torpilles) constituant l'ordre des Tetracophyllidea et dont la paraphylie est avérée (Caira et al., 2014).

En 2014, Caira et ses co-auteurs ont mis de l'ordre dans la phylogénie de ces plathelminthes hébergés par les élasmobranches, en élevant les familles Phyllobothriidae et Onchobothriidae de l'ordre de Tetracophyllidea au rang de deux nouveaux ordres, respectivement les Phyllobothriidea et les Onchoproteocephalidea (Caira et Jensen, 2017). En conséquence, 19 ordres de cestodes sont désormais reconnus. Caira & Jensen (2017) ont mis à jour la phylogénie profonde des Cestoda trouvées chez les vertébrés. 4810 espèces ont été recensées et validées chez les 19 ordres, ainsi que leurs principaux groupes hôtes (**Tableau V**). L'ordre des Cyclophyllidea reste de loin le plus riche en espèces, avec plus de 50 % de toute la diversité de cestodes connue, suivi par les Onchoproteocephalidea avec 562 espèces et 79 genres (Caira et Jensen, 2017).

Tableau V : Nombre d'espèces valides de chaque ordre de cestodes et les principaux groupes vertébrés hôtes (Caira et Jensen, 2017)

Ordre	Hôtes principaux	Nombre d'espèces
Amphilinidea	poissons osseux, tortues	8
Bothriocephalidea	poissons osseux	132
Caryophyllidea	poissons osseux	122
Cathetocephalidea	Elasmobranches	6
Cyclophyllidea	oiseaux, mammifères, lézards et serpents	3034
Diphylloidea	Elasmobranches	59
Diphyllobothriidea	Mammifères	70
Gyrocotylidea	Holocéphales	10
Haplobothriidea	poissons osseux	2
Lecanicephalidea	Elasmobranches	90
Litobothriidea	Elasmobranches	9
Nippotaeniidea	poissons osseux	6
Onchoproteocephalidea		
Onchoproteocephalidea I	poissons osseux, tortues, oiseaux, mammifères, lézards et serpents	316
Onchoproteocephalidea II	élasmobranches	246
Phyllobothriidea	Elasmobranches	69
Rhinebothriidea	Elasmobranches	136
Spathobothriidea	poissons osseux	6
Tetrabothriidea	oiseaux, mammifères	70
“Tetracophyllidea” reliques	Elasmobranches	104
Trypanorhyncha	Elasmobranches	315
Total		4 810

De plus, ces auteurs ont démontré le rôle important des élasmobranches en tant qu'hôtes définitifs pour ces parasites. Cependant, leurs cycles de vie sont particulièrement mal connus. La raison étant la difficulté d'identification et d'association des larves de cestodes aux adulte (Caira & Jensen, 2014). Par conséquent, les larves de ces cestodes sont difficiles à identifier avec précision en utilisant les critères morphologiques (Jensen et Bullard, 2010; Caira et al., 2020). Néanmoins, les méthodes moléculaires ont permis de surmonter cette contrainte par l'enrichissement, bien que encore insuffisant, des banques moléculaires en séquences nucléotidiques provenant de différents marqueurs génétiques obtenus sur des cestodes d'élasmobranches (Brickle et al., 2001; H. Randhawa et Brickle, 2011; Caira & Jensen, 2017; Tedesco et al., 2020; Caira et al., 2021).

I.4. Notion de phylogénie

I.4.1. Généralités

Le terme « phylogénie » fut inventé par *Ernst Haeckel* en 1866 pour définir l'enchaînement des espèces animales et végétales au cours du temps (Darlu & Tassy, 2004), puis repris par Charles Darwin en 1872 dans la dernière édition du livre *On the Origin of Species*. Mais le concept de la phylogénétique (la science des arbres évolutifs) est née un peu plus tôt. En 1859, Darwin a introduit dans sa première édition du livre *On the Origin of Species* la théorie selon laquelle les espèces évoluent au fil des générations, grâce à l'accumulation graduelle de différences dans les sous-populations d'une espèce. Cette théorie est accompagnée de la représentation d'un arbre phylogénétique, le premier jamais réalisé. La phylogénie est définie aujourd'hui comme l'histoire de la formation et de l'évolution d'une espèce (Darlu & Tassy, 2004), ou comme la reconstruction du processus naturel de divisions répétées des populations par divergence génétique irréversible.

Un arbre phylogénétique est un graphe illustrant les relations de parenté. Il est composé d'une succession de branches dont la jonction forme des nœuds correspondant à des ancêtres communs inférés, à partir desquels divergent des lignées différentes. À l'extrémité des branches terminales, les feuilles figurent les taxons étudiés (**Figure 7**). Ces taxons forment soit un groupe monophylétique (contient tous les descendants d'un seul ancêtre), appelé aussi clade, soit un groupe polyphylétique (contient des espèces dérivées de différentes lignées souches et n'inclut pas tous les descendants du dernier ancêtre commun) ou bien un groupe paraphylétique (ne contient que certains et pas tous les descendants d'un même ancêtre).

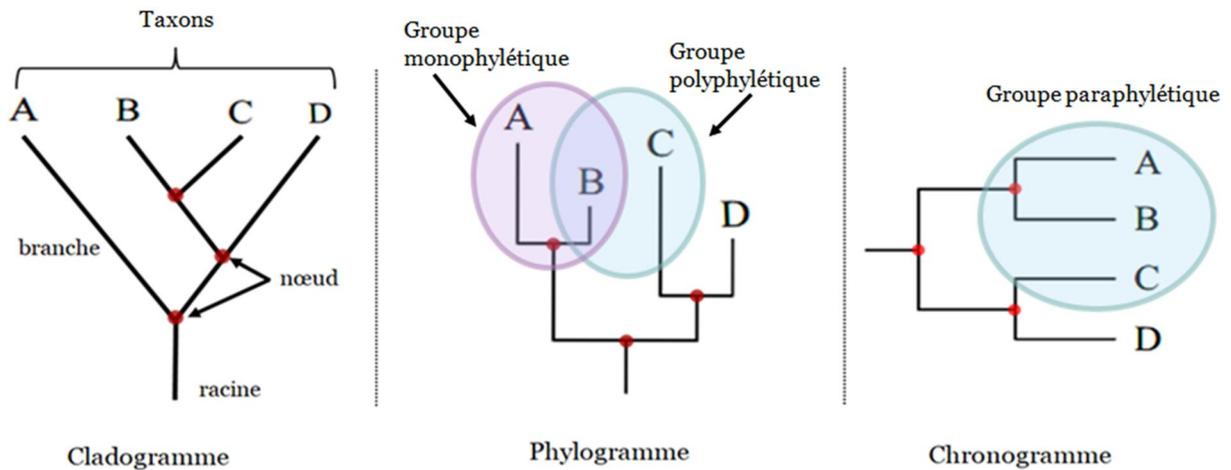


Figure 7. Les différentes représentations d'un arbre phylogénétique et les groupements possibles de taxons.

La signification de la longueur de ces branches dépend du type d'arbre en question. Dans un cladogramme, la longueur des branches n'a aucune signification (Casane et Laurenti, 2012); mais cette longueur peut être une mesure quantitative des modifications de séquences génétiques (mutation) ou des distances génétiques dans un phylogramme, les deux branches qui se rejoignent à un nœud n'ont pas la même longueur si les changements s'accroissent à une plus grande vitesse dans une lignée par rapport à l'autre. Elle peut aussi représenter le temps écoulé entre deux nœuds dans un chronogramme (Casane et Laurenti, 2012).

I.4.2. Phylogénie moléculaire

Cette discipline repose sur l'analyse comparative des séquences nucléotidiques ou protéiques, en supposant qu'ils sont homologues (partagent un ancêtre commun) (Lemey et al., 2009; Amit Roy, 2014). Elle a pour but de reconstruire les relations de parenté entre les organismes en essayant de retracer l'accumulation des mutations (insertions, délétion, duplication...) au cours de l'évolution des espèces. Etant donné que la phylogénie moléculaire vient compléter les méthodes traditionnelles de classification basées sur l'observation des caractères morphologiques et anatomiques, elle permet donc d'étudier l'organisme sur le plan phénotypique et génotypique.

L'application de techniques de séquençage d'acides nucléiques puissantes et ultra rapides aux études phylogénétiques, a conduit à une accumulation de grandes quantités de données de séquence, ce qui a nécessité le développement de bases de données numérisées pour le stockage de ces données telles que le National Center for Biotechnology Information (NCBI), la National

Library of Medicine (NLM), le European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ou la DNA Database of Japan (DDJ) (Lemey et al., 2009). Pour pouvoir traiter toutes ces informations, des outils d'analyse mathématique et statistique robustes sont essentiels. Les logiciels bioinformatique tels que MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) et PHYLIP (Pylogeny Inference Package) ou Clustal implémentent plusieurs algorithmes et sont particulièrement bien adaptés pour analyser rapidement des ensembles de données relativement volumineux et avoir le meilleur résultat grâce auxquels le chercheur peut tirer des hypothèses sur les liens génétiques des espèces, les états ancestraux des caractères étudiés, la divergence ou la convergence des caractères.

L'utilisation de marqueurs génétiques dans la phylogénie moléculaire de divers organismes est devenue de plus en plus importante (Amit Roy, 2014). Le gène de l'ADNr 28S (la grande sous-unité) par exemple, est un marqueur moléculaire couramment utilisé pour les études phylogénétiques des plathelminthes et des taxons apparentés (Bennett et al., 2019). D'après de nombreux travaux (Fyler et Caira, 2010; Bennett et al., 2019; Tedesco et al., 2020; Caira et al., 2021), les régions D1-D3 de ce gène (**Figure 8**) se sont révélées informatives pour définir les limites des espèces et pour résoudre les relations phylogénétiques interspécifiques entre les cestodes.

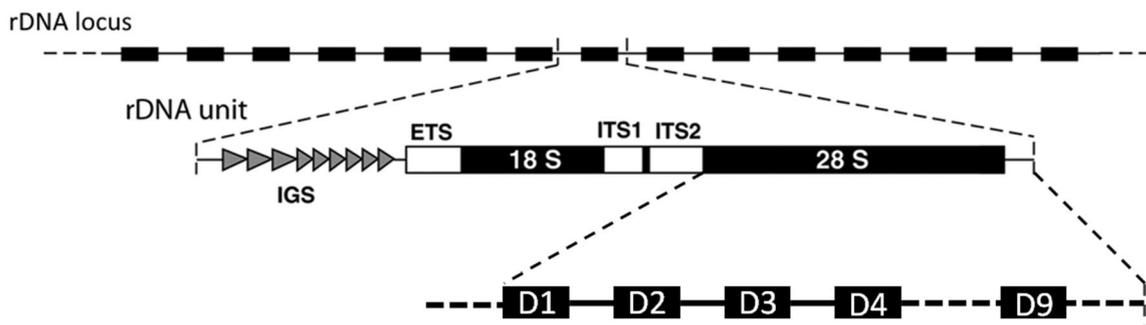


Figure 8. Représentation schématique du gène de l'ADNr 28S (Eickbush et Eickbush, 2007 modifié)

I.4.3. Modèles et méthodes de la phylogénie moléculaire

Les modèles de phylogénie moléculaire peuvent être classés en 2 groupes selon la stratégie qu'elles utilisent (**Tableau VII**). Par exemple l'approche algorithmique neighbour-joining (NJ) ainsi que Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) font partie des méthodes basées sur la distance (également appelées méthodes algorithmiques). Le Maximum de parcimonie (MP), Maximum de vraisemblance (ML) et l'approche bayésienne sont les plus

utilisées des méthodes basées sur les caractères (méthodes de recherche d'arbre) (Samarasinghe et al., 2019). Il existe plusieurs logiciels gratuits mettant à disposition ces modèles phylogéniques. Certains sont spécifiques pour une seule approche algorithmique et d'autres proposent toute une gamme (**Tableau VI**).

Tableau VI : Caractéristique des algorithmes d'inférence les plus courants et les logiciels bioinformatiques les prenant en charge

Méthodes	Description	Logiciels
MP	Algorithme basé sur des caractères qui vise à trouver l'arbre ou l'ensemble d'arbres optimal (le plus parcimonieux) en minimisant les changements évolutifs	PAUP* MEGA PHYLIP
ML	Algorithme basé sur des caractères qui repose sur la fiabilité statistique. Il vise à maximiser la valeur de la vraisemblance d'une hypothèse (topologie arborescente) en utilisant une fonction de vraisemblance et à obtenir la meilleure estimation de la vraie topologie	PAUP* MEGA PHYLIP PhyML RAxML
Approche bayésienne	Un algorithme basé sur des caractères, qui est également construit sur une fonction de vraisemblance. Mais contrairement à ML, il attribue une distribution de probabilité aux paramètres de nuisance plutôt que de les garder constants et utilise le modèle Markov chain Monte Carlo (MCMC) pour trouver les arbres optimaux	MrBayes BEAST
UPGMA / NJ	Se concentrent sur le calcul des distances entre les paires de séquences et la recherche d'une topologie qui correspond le plus possible à ces distances évolutives	PAUP* MEGA PHYLIP

Reconstituer la phylogénie à partir d'alignements de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas aussi simple qu'on pourrait l'espérer. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes, il est rarement possible de vérifier que l'on est arrivé à la bonne conclusion, d'autant plus que chacune de ces méthodes a des limites et des faiblesses (**Tableau VII**), et aucune d'elles ne garantit que l'arbre phylogénétique inféré soit totalement juste (Lemey et al., 2009).

Tableau VII : Comparaison des forces et faiblesses relatives des méthodes les plus courantes de reconstruction phylogénétique (Sleator, 2011; Samarasinghe et al., 2019)

	Méthodes	Force	Faiblesse
Basée sur la distance	UPGMA	<ul style="list-style-type: none"> • Utilise un modèle d'évolution moléculaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Fournit un seul arbre • Branche présentée sous forme de distances par opposition à des caractères discrets • Impossible de déduire les états ancestraux • Ne peut pas identifier les caractères individuels qui sont informatifs ou problématiques
	NJ	<ul style="list-style-type: none"> • Fournit une longueur de branche • Calculs rapides 	
Basée sur les caractères	Maximum parsimony	<ul style="list-style-type: none"> • Minimise le nombre d'étapes et donc le nombre d'hypothèses supplémentaires • Identifie de nombreux arbres parcimonieux à partir desquels un consensus est calculé • Fournit des diagnostics pour chaque longueur de clade et de branche en termes de nombre de changements sur chaque branche d'un arbre • Peut déduire des états ancestraux • Peut identifier des caractères individuels qui sont informatifs ou problématiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Relativement lent par rapport à NJ, en particulier lorsqu'il s'agit de grands ensembles de données • Ne convient pas aux ensembles de données très divergents • Pas idéal lorsque les taux de mutation sont très inégaux et les lignées sont en évolution rapide
	Maximum likelihood	<ul style="list-style-type: none"> • Bases statistiques solides • Permet la comparaison de différents arbres, paramètres et modèles • Hautement précis • Peut être utilisé pour les ensembles de données avec une divergence de séquence élevée • Peut déduire des états ancestraux • Permet l'identification des caractères individuels qui sont informatifs ou problématiques 	
	Approche bayésienne	<ul style="list-style-type: none"> • Peut être utilisé pour les ensembles de données avec une divergence de séquence élevée • Hautement précis 	

Toutes les méthodes énoncées plus haut peuvent ou doivent être complétées par un bootstrap, une méthode statistique utilisée pour vérifier la robustesse et la fiabilité de l'arbre obtenu. Une valeur de bootstrap (pourcentage entre 0 et 100%) est associée à chaque branche de l'arbre (**Figure 9**) indiquant le nombre de fois où cette branche a été retrouvée au fil des répétitions.

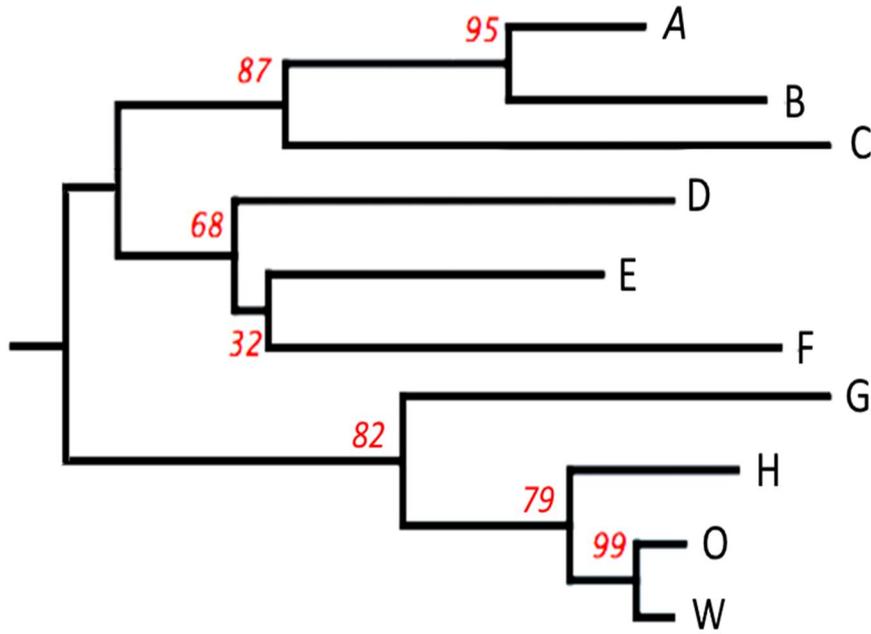


Figure 9. Représentation des valeurs du bootstrap sur un arbre phylogénétique

II. Matériels et méthodes

L'étude a été réalisée à l'université Saad Dahleb Blida 1, faculté des sciences de la nature et de la vie, département BPC, de mars à juin 2021. Elle a consisté en une étude phylogénique de séquences d'ADN obtenues à partir de cestodes parasitant le céphalopode *Sepia officinalis*.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Deux spécimens adultes de *Sepia officinalis* (un mâle et une femelle) (**Figure 10**) provenant de captures réalisées au chalut, le 06 Avril 2021. Ces seiches ont été achetées directement chez des pêcheurs du village côtier de Ain Tagourait (anciennement Bérard), situé dans la wilaya de Tipaza, le même jour et gardées au frais. Elles ont été transportées au laboratoire le lendemain 07 Avril 2021, dans une glacière, pour être traitées.



Figure 10. Spécimens de *Sepia officinalis* pêchés au niveau de Ain Tagourait, Wilaya de Tipaza.

II.1.2. Matériel non biologique

II.1.2.1. Matériel du laboratoire

La récolte des cestodes parasitant *Sepia officinalis* a nécessité le matériel suivant :

- | | |
|----------------|----------------------|
| - Ethanol 70% | - Loupe binoculaire |
| - Eau distillé | - Eprouvette graduée |
| - Ciseau | - Pipettes pasteur |
| - Gants | - Pissette |
| - Pinces | - Micropipette |
| - Scalpel | - Boîtes de Pétri |
| - bacs | - Flacon |

II.1.2.2. Séquences nucléotidiques

8 séquences nucléotidiques correspondant au domaine D1-D3 de l'ADNr 28S, générées par l'analyse moléculaire de larves pléroceroïdes récoltées chez la seiche *Sepia officinalis* (céphalopode) ont servi à l'étude phylogénétique. Deux autres séquences ont également été intégrées dans notre analyse, l'une correspondant à une séquence obtenue à partir d'une larve pléroceroïde récoltée chez le poulpe *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (céphalopode) et une séquence obtenue d'un cestode adulte récolté chez la raie *Raja asterias* Delaroche, 1809 (élastmobranche).

Par conséquent notre étude a compris 10 séquences.

La raie et les 2 espèces de céphalopodes ont été capturées au cours d'opérations de pêche menées sur le littoral algérois (Benyahia, communication personnelle). Le prélèvement des hôtes et des cestodes, la PCR ainsi que le séquençage ont été réalisés dans le cadre d'un projet de recherche national (Benyahia, communication personnelle) en suivant le protocole détaillé en **Annexe 1**.

3 séquences ont été générées par l'analyse moléculaire des 8 individus analysés.

- La première séquence dont la taille est de **1263pb**, est partagée par 3 larves récoltées chez *Sepia officinalis*, notées **S1**, **S2** et **S3**
- La deuxième séquence de **1289pb** est partagée par 5 larves, dont 3 récoltées chez *Sepia officinalis* (**S4**, **S5** et **S6**), une récoltée chez le poulpe *Octopus vulgaris* désignée par **OV1** et une cinquième correspondant à un cestode adulte récolté chez la raie *Raja asterias* et noté **Ra1**
- La troisième séquence de **1297pb** est partagée par 2 larves récoltées chez *Sepia officinalis* marquées **S7** et **S8**

Le domaine D2 (voir Annexe) situé à l'intérieur du domaine D1-D3 de l'ADNr 28S a également servi à une analyse phylogénétique des mêmes 10 cestodes de notre étude.

II.1.2.3. Outils bioinformatiques

Pour l'analyse moléculaire les outils suivant ont été utilisés :

- BLASTn ou Nucléotide BLAST (McGinnis & Madden, 2004):

Programme de comparaison de séquences nucléotidiques, utilisant un algorithme de recherche des segments similaires entre une séquence nucléotidique requête et toutes celles présentes dans la banque de données du NCBI.

- MEGA X logiciel qui permet d'effectuer une analyse statistique de l'évolution moléculaire, l'alignement et la construction des arbres phylogénétiques (Kumar et al., 2018). Ce logiciel intègre plusieurs programmes dont ClustalW qui a été utilisé pour l'alignement multiple.

II.2. Méthodes

La méthodologie suivie pour le prélèvement des parasites dans notre étude, a été réalisée au niveau du laboratoire de la station expérimentale de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

II.2.1. Prélèvement

Nous avons procédé à la dissection et à l'examen de deux seiches *Sepia officinalis* pour y rechercher la présence éventuelle de cestodes. Au cours de cette procédure, nous avons observé la présence de spermatophores dans la poche de Needham (ou poche spermatophorique) chez le mâle et d'œufs lisses remplissant l'oviducte de la femelle (**Figure 11**). Les 2 individus étaient sexuellement matures.



Figure 11. Dissection des deux individus *Sepia officinalis* (femelle à gauche et mâle à droite)

Pour une meilleure visibilité du tractus digestif, la poche d'encre a été enlevée chez les 2 seiches (**Figure 12**). Après isolement, les tractus digestifs ont été extraits et déposés dans des boîtes de Petri remplies d'eau distillée, puis l'estomac et l'intestin ont été répartis dans des boîtes distinctes.

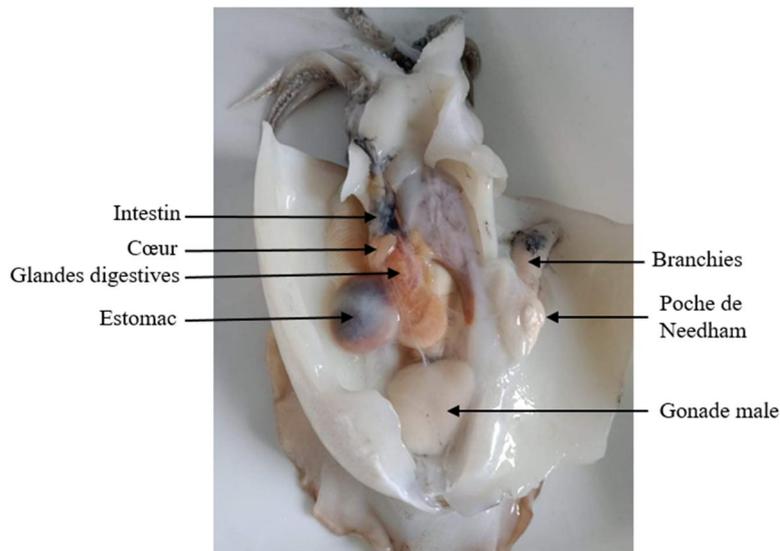


Figure 12. Organes internes de l'individu mâle de *Sepia officinalis*

Une exploration minutieuse des parois de l'intestin et de l'estomac a été effectuée sous une loupe binoculaire. Elle a permis la découverte d'une larve vivante collée à la paroi de l'estomac du mâle (**Figure 13**). Celle-ci a été prélevée à l'aide d'une pipette et conservée dans un petit flacon contenant de l'éthanol 70% préalablement préparé en diluant 100 ml d'éthanol 96% dans 40.85 ml d'eau distillée. Le flacon a été étiqueté avec les références de cette larve (Hôte, sexe de l'hôte, date de prélèvement, type de larve)



Figure 13. Larve de cestode (signalée par la tête de flèche noire) observée sous une loupe binoculaire au niveau de l'estomac d'un spécimen mâle de *Sepia officinalis*

II.2.2. Identification moléculaire

Les étapes de l'identification moléculaire des parasites prélevés sont représentées dans le diagramme suivant :

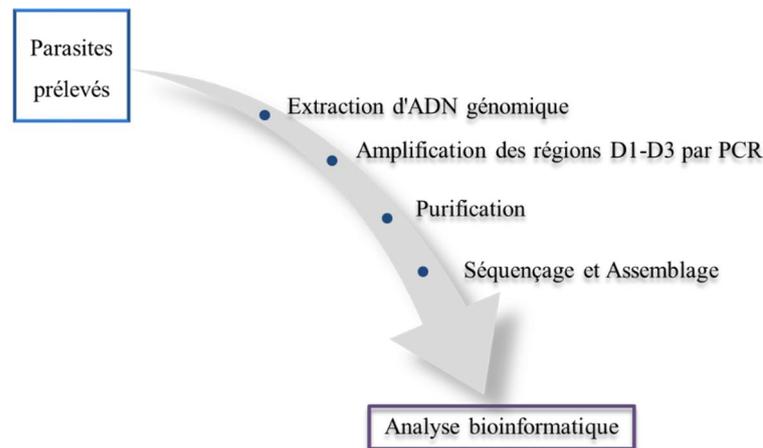


Figure 14. Workflow de l'identification moléculaire des parasites trouvés

Malheureusement, l'extraction d'ADN, la PCR, la purification et le séquençage n'ont pas été réalisés dans cette étude par manque de matériels. Cependant, l'analyse bioinformatique a été faite sur des séquences obtenues de 10 cestodes prélevés chez *Sepia officinalis*, dans le cadre d'un projet de recherche national (Benyahia, communication personnelle).

II.2.3. Analyse bioinformatique

L'analyse phylogénétique des 10 cestodes a été menée sur la région variable D1–D3 et une région à l'intérieur de celle-ci, le D2, de l'ADNr 28S.

Les deux analyses de ces deux régions nucléotidiques ont été traitées séparément en suivant la même procédure.

II.2.3.1. BLAST

Le programme BLASTn a servi à la recherche de séquences nucléotidiques sur Genbank, similaire à celles de notre étude, basée sur les critères suivants :

- séquence du Gene ADNr 28S ou d'un segment comprenant les régions D1-D3 et/ou D2
- pourcentage d'identité élevé
- pourcentage de query cover (couverture de la requête) élevé
- valeurs de l'E-value égale à 0

En plus de ces séquences, deux autres ont été obtenues de Genbank (KF685883.1 et MT732143.1) pour servir d'extra-groupe afin d'enraciner les arbres phylogénétiques.

II.2.3.2. Alignement multiple par Clustalw

Deux alignements distincts ont été réalisés, l'un sur le domaine D1-D3 de l'ADNr 28s et l'autre sur le domaine D2 situé à l'intérieur du domaine D1-D3.

- Dans le premier cas, les 10 séquences de notre analyse, auxquelles nous avons rajouté 35 séquences parmi les plus similaires obtenues de Genbank après le BLAST, ont servi pour l'alignement des séquences.
- Dans le cas du D2, 16 séquences parmi les 35 de l'alignement précédent ont servies dans le deuxième alignement, avec 8 autres du tableau IX et les 10 séquences D2 des cestodes étudiés.

La forme FASTA a été utilisée pour toutes ces séquences. Et les deux alignements multiples ont été réalisés à l'aide de l'outil Clustalw inclus dans le logiciel MEGA X (téléchargé gratuitement depuis le site officiel de MEGA). Ce logiciel a permis également de déterminer les sites informatifs, qui correspondent à des gaps, des délétions ou des insertions de nucléotides, ou des mismatches (mésappariements) représentant des substitutions. Mais toutes ces mutations ne sont pas forcément naturelles, elles peuvent-être le résultat d'une erreur qui s'est produite dans la manipulation des données après l'extraction d'ADN.

II.2.3.3. Reconstruction de la phylogénie

Les 2 arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide de MEGA X. Ce logiciel a déduit l'histoire de l'évolution en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (maximum likelihood) et le modèle Tamura-Nei. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique ont été obtenus automatiquement en appliquant les algorithmes Neighbor-Join et BioNJ à une matrice de distances par paires estimées à l'aide du modèle Tamura-Nei, puis en sélectionnant la topologie avec une valeur de probabilité de log supérieure. L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branches mesurées en nombre de substitutions par site.

Pour estimer la robustesse des nœuds, les valeurs des bootstraps ont été calculées pour 500 répliques dans chaque arbre. Les supports au niveau des nœuds sont considérés au-delà de 50%.

III. Résultats

Dans la présente étude, 10 individus de cestodes ont servi à l'analyse : 8 larves plérocercoides obtenues chez la seiche *Sepia officinalis*, une larve obtenue chez *Octopus vulgaris* et un adulte récolté chez la raie *Raja asterias*. L'analyse moléculaire du domaine D1-D3 de l'ADNr 28S de ces 10 parasites a généré des séquences de tailles variables selon les individus. Un décryptage minutieux a révélé que ces séquences étaient réparties en 3 groupes (**Tableau VIII**), composés chacun de 2, 3 et 5 individus. Les tailles respectives de ces segments d'ADN de chacun des groupes étaient de 1297pb, 1263pb et 1289pb.

Les résultats du BLAST ont montré que les séquences enregistrées provenant des cestodes *Acanthobothrium sp* 16/04 (MN660287.1), *Acanthobothrium sp* 16/01b (MN660285.1), *Acanthobothrium sp* 16/01c (MN660286.1), *Acanthobothrium sp* 16/64 (MN660289.1) et *Acanthobothrium sp* 15/33b (MN660283.1) (**Tableau IX**), présentaient la plus grande similitude génétique, avec une identité génétique de plus de 99% (**Tableau VIII**) et une valeur d'E-value de 0. Ces séquences proviennent de larves plérocercoides de cestodes qui appartiennent au genre *Acanthobothrium* récoltées dans l'intestin du poulpe *Octopus vulgaris* pêché dans les eaux tyrrhéniennes des côtes italiennes (Tedesco *et al.*, 2020).

Un deuxième BLAST a été réalisé sur les séquences du domaine D2, pour une meilleure fiabilité dans l'identification. La comparaison de ces séquences, de 654pb chacune, a révélée une similitude de 100% entre le groupe composé de 2 individus (**S7** et **S8**) et 3 des séquences citées dans le **Tableau VIII**, avec un E-value toujours égal à 0 et un Query cover (recouvrement) de 100%. Il est donc évident qu'ils partagent la même identité génétique.

Tableau VIII. Résultats du BLAST présentant les plus grandes similitudes génétiques

Séquences	Taille (pb)	Séquences de Genbank	D1-D3		D2	
			% identité	Query cover	% identité	
S1 ; S2 ; S3	1289	<i>Acanthobothrium sp.16/04</i>	99.44%	99%	100%	99.08%
S4;OV1; Ra1; S5; S6	1263	<i>Acanthobothrium sp.16/01b</i>	99.52%	97%	100%	99.39%
		<i>Acanthobothrium sp.16/01c</i>	99.37%	98%	100%	98.93%
S7 ; S8	1297	<i>Acanthobothrium sp.16/64</i>	99.92%	97%	100%	100.00%
		<i>Acanthobothrium sp.16/01c</i>	99.92%	97%	100%	100.00%
		<i>Acanthobothrium sp.15/33b</i>	99.92%	97%	100%	100.00%

L'alignement multiple des séquences D1-D3 réalisé avec nos 10 séquences et 35 séquences sélectionnées à partir du BLAST (**Tableau IX**) a fait ressortir 701 sites informatifs sur les 1568

nucléotides de l'alignement. L'analyse de ces sites a révélé quelques transitions et transversions entre nos séquences et celles qui partagent les identités génétiques les plus élevées :

- Entre le premier groupe (S1, S2 et S3) et *Acanthobothrium* sp.16/04 il y a 2 transversions au niveau des positions 364 et 891 et 4 transitions sur les sites 36, 563 et 613.
- Entre le deuxième groupe (S4, S5, S6, OV1, Ra1) et *Acanthobothrium* sp.16/01c il y a 2 transversions au niveau des positions 47 et 379, 3 transitions sur les sites 364, 527 et 639.
- Entre le troisième groupe (S7 et S8) et *Acanthobothrium* sp.16/64, *Acanthobothrium* sp.16/01c, *Acanthobothrium* sp.15/33b, il n'y a qu'une seule transversion au site 1309.

Ces sites informatifs peuvent être soit des mutations naturelles soit des erreurs de manipulation au cours de l'amplification par PCR ou au cours du séquençage.

Tableau IX : Taxa obtenus de Genbank, inclus dans l'analyse phylogénétique

Individus	Ordre	Hôtes	Localisation	N° d'accès Genbank
<i>Acanthobothrium</i> sp.16/04	Onch	<i>Octopus vulgaris</i>	Mer tyrrhénienne	MN660287.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 16/64	Onch	<i>Octopus vulgaris</i>	Mer tyrrhénienne	MN660289.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 16/01c	Onch	<i>Octopus vulgaris</i>	Mer tyrrhénienne	MN660286.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 16/01b	Onch	<i>Octopus vulgaris</i>	Mer tyrrhénienne	MN660285.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 15/33b	Onch	<i>Octopus vulgaris</i>	Mer tyrrhénienne	MN660283.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 16/30	Onch	<i>Octopus vulgaris</i>	Mer tyrrhénienne	MN660288.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 16/01a	Onch	<i>Octopus vulgaris</i>	Mer tyrrhénienne	MN660284.1
<i>Acanthobothrium</i> <i>brevissime</i>	Onch	<i>Ensis minor</i> Dall	États-Unis: Floride	GQ470112.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-218-1	Onch	<i>Lagodon rhomboides</i>	Nord du golfe du Mexique	KF685751.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-47-8	Onch	<i>Diplectrum formosum</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470123.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-47-7	Onch	<i>Diplectrum formosum</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470122.1
<i>Acanthobothrium</i> <i>wedli</i> voucher Haseeb Randhawa: P962	Onch	<i>Zearaja nasuta</i>	Nouvelle-Zélande : île du Sud	MH913271.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 6C KJ-2010 voucher MS05-50-9	Onch	<i>Dasyatis say</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470113.1
<i>Acanthobothrium</i> <i>wedli</i> isolate 13CD	Onch	<i>Zearaja nasuta</i>	Nouvelle-Zélande : Otago	MH924012.1
<i>Acanthobothrium</i> <i>wedli</i> isolate 9CL	Onch	<i>Zearaja nasuta</i>	Nouvelle-Zélande	MH924011.1
<i>Acanthobothrium</i> <i>wedli</i> isolate 13CH	Onch	<i>Zearaja nasuta</i>	Nouvelle-Zélande	FJ357445.1
<i>Acanthobothrium</i> <i>santarosaliense</i> isolate TE-136	Onch	<i>Heterodontus mexicanus</i>	Basse-Californie du Sud du Mexique	GQ470115.1
<i>Acanthobothrium</i> <i>wedli</i> voucher: P961	Onch	<i>Zearaja nasuta</i>	Nouvelle-Zélande :	MH913270.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 2 voucher OMNZ:IV5693	Onch	<i>Zearaja nasuta</i>	Nouvelle-Zélande : île du Sud	MH686154.1

Onch : Onchoproteocephalidea

Phyll : Phyllobothriid

Tableau IX (suite) : Taxa obtenus de Genbank, inclus dans l'analyse phylogénétique

Nom	Ordre	Hôtes	Localisation	N° Genbank
<i>Acanthobothrium</i> sp. 6B KJ-2010 voucher MS05-50-7	Onch	<i>Dasyatis say</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470110.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 6A KJ-2010 voucher MS05-50-4	Onch	<i>Dasyatis say</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470108.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 6B KJ-2010 voucher MS05-50-8	Onch	<i>Dasyatis say</i>	Nord du golfe du Mexique	MH924013.1
<i>Acanthobothrium hypermekkolpos</i> isolate CF33	Onch	<i>Rhynchobatus laevis</i>	Australie	HQ917929.1
<i>Acanthobothrium hypermekkolpos</i> isolate CF34	Onch	<i>Rhynchobatus laevis</i>	Australie	HQ917930.1
<i>Acanthobothrium mattaylori</i> isolate CF31	Onch	<i>Rhynchobatus laevis</i>	Australie	FJ843592.1
<i>Acanthobothrium oceanharvestae</i> isolate CF-93	Onch	<i>Himantura</i> sp	Nord de l'Australie	FJ843594.1
<i>Acanthobothrium romanowi</i> isolate CF-116	Onch	<i>Himantura</i> sp	Nord de l'Australie	FJ843598.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. JNC-2009 isolate CF-53	Onch	<i>Himantura</i> sp	Nord de l'Australie	MH688727.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 4 HR-2018	Onch	<i>Bathyraja magellanica</i>	Îles Falkland	MH688726.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 4 HR-2018	Onch	<i>Bathyraja cousseauae</i>	Îles Falkland	HQ917927.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 3 HR-2018	Onch	<i>Raja montagui</i>	La mer du Nord	MH688724.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. 3 HR-2018	Onch	<i>Leucoraja naevus</i>	La mer du Nord	MH688725.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-568-1	Onch	<i>Cynoscion nebulosus</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470121.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-47-15	Onch	<i>Diplectrum formosum</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470119.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-47-3	Onch	<i>Diplectrum formosum</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470116.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-47-16	Onch	<i>Diplectrum formosum</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470120.1
<i>Acanthobothrium</i> sp. MS05-47-4	Onch	<i>Diplectrum formosum</i>	Nord du golfe du Mexique	GQ470117.1
<i>Acanthobothrium flicolle</i> voucher Haseeb Randhawa: P484	Onch	<i>Zearaja nasuta</i>	Nouvelle-Zélande : Île du sud	MH913266.1
<i>Onchobothrium antarcticum</i> isolate 3	Onch	<i>Notothenia rossii</i>	La baie de l'Amirauté	KF882020.1
<i>Onchobothrium antarcticum</i> isolate 2	Onch	<i>Notothenia rossii</i>	La baie de l'Amirauté	KF882021.1
<i>Acanthobothrium parviuncinatum</i>	Onch	Indéterminé	--	EF095264.1
<i>Crossobothrium laciniatum</i> solate TE- 127	Phyll	<i>Hexanchus griseus</i>	Chili : Océan Pacifique	KF685883.1

<i>Clistobothrium tumidum</i> isolate LN-15-1v	Phyll	<i>Carcharodon carcharias</i>	États-Unis : ocean Atlantique	MT732143.1
------------------------------------------------	-------	-------------------------------	-------------------------------	------------

La reconstruction phylogénétique basée sur le modèle du Maximum Likelihood a générée 1 arbre consensus (Figure 15).

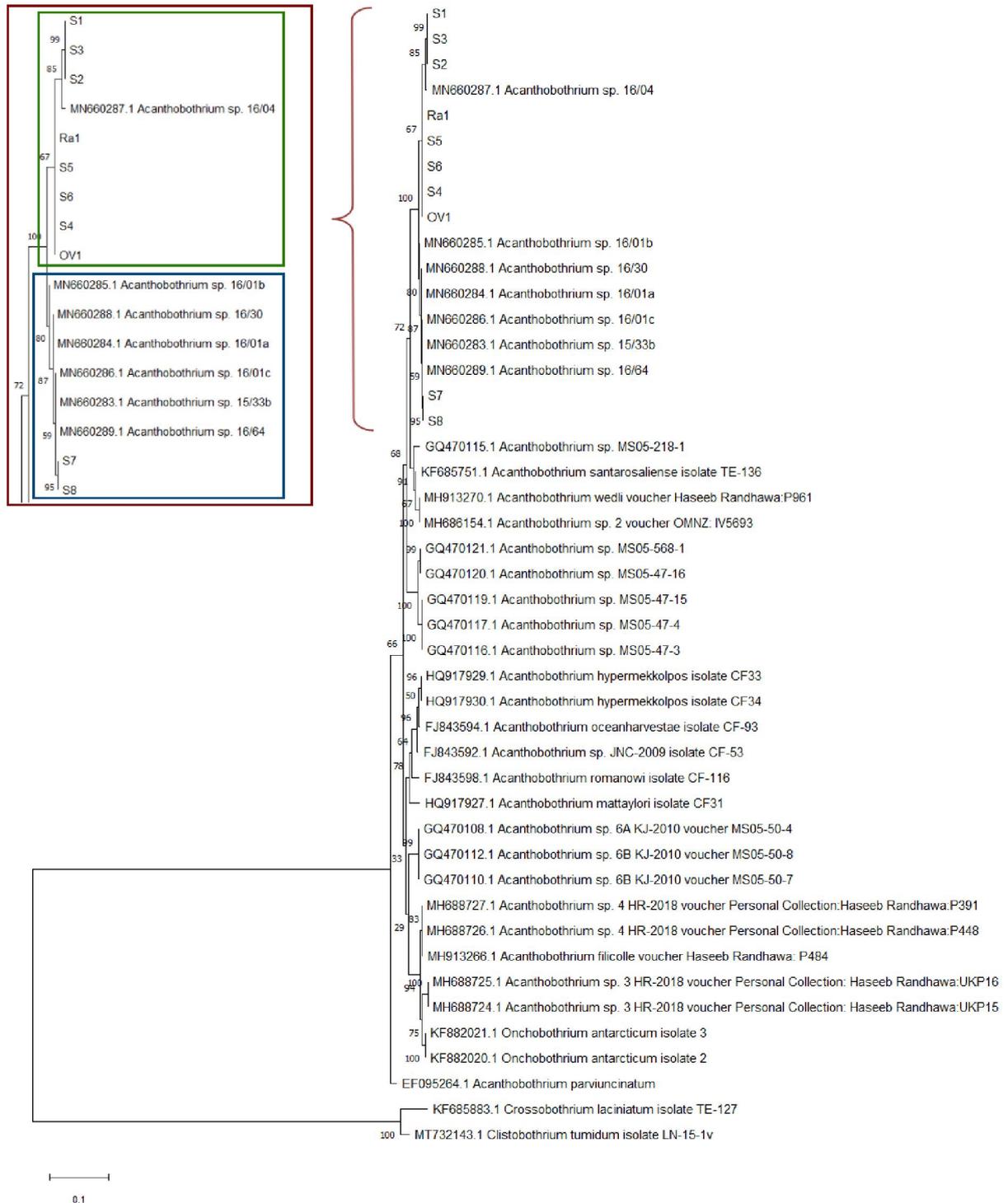


Figure 15. Arbre phylogénétique reconstituant les relations des larves de cestodes récoltées chez *Sepia officinalis* Linnaeus 1758 pêché dans les eaux du littoral algérois. L’arbre est reconstruit par la méthode du Maximum likelihood. Le support nodal n’est considéré que pour les valeurs supérieures à 50%. L’encart est un agrandissement sur le clade regroupant nos séquences

Les 3 sous-groupes formés par les 10 cestodes récoltés chez *Sepia officinalis* forment 1 même clade où il apparait que :

- le groupe constitué des larves plérocercoides S1, S2, S3, est le plus proche de celui composé de S4, S5, S6, OV1 et Ra1 et présente la plus grande affinité phylogénétique avec la larve *Acanthobothrium* sp. 16/04 (MN660287.1) récoltée en Italie chez *Octopus vulgaris* (Tedesco et al. (2020) et dont il forme le clade frère (**Figure 15, encadré vert**).

- le groupe comprenant S7 et S8 a pour clade frère celui formé par *Acanthobothrium* sp. 16/64 (MN660289.1), *Acanthobothrium* sp. 15/33b (MN660283.1) et *Acanthobothrium* sp. 16/01c (MN660286.1) correspondant aux larves de cestodes récoltées chez *Octopus vulgaris* par Tedesco et al. (2020) dans les eaux italiennes (**Figure 15, encadré bleu**).

- Toutes les larves de notre analyse sont regroupées dans un clade monophylétique ne comprenant que des individus correspondant au genre *Acanthobothrium* (**Figure 15**).

Ils partagent donc un ancêtre commun dont ils dérivent, ce qui prouverait que les larves de notre étude sont congénériques à *Acanthobothrium*.

Le deuxième arbre phylogénétique (**Figure 16**) construit à partir de l'analyse du segment D2 confirme les résultats précédents. L'alignement des 10 séquences du domaine D2 de l'ADNr 28S et de 24 séquences obtenus de Genbank, a présenté 1532 caractères dont 676 sites informatifs.

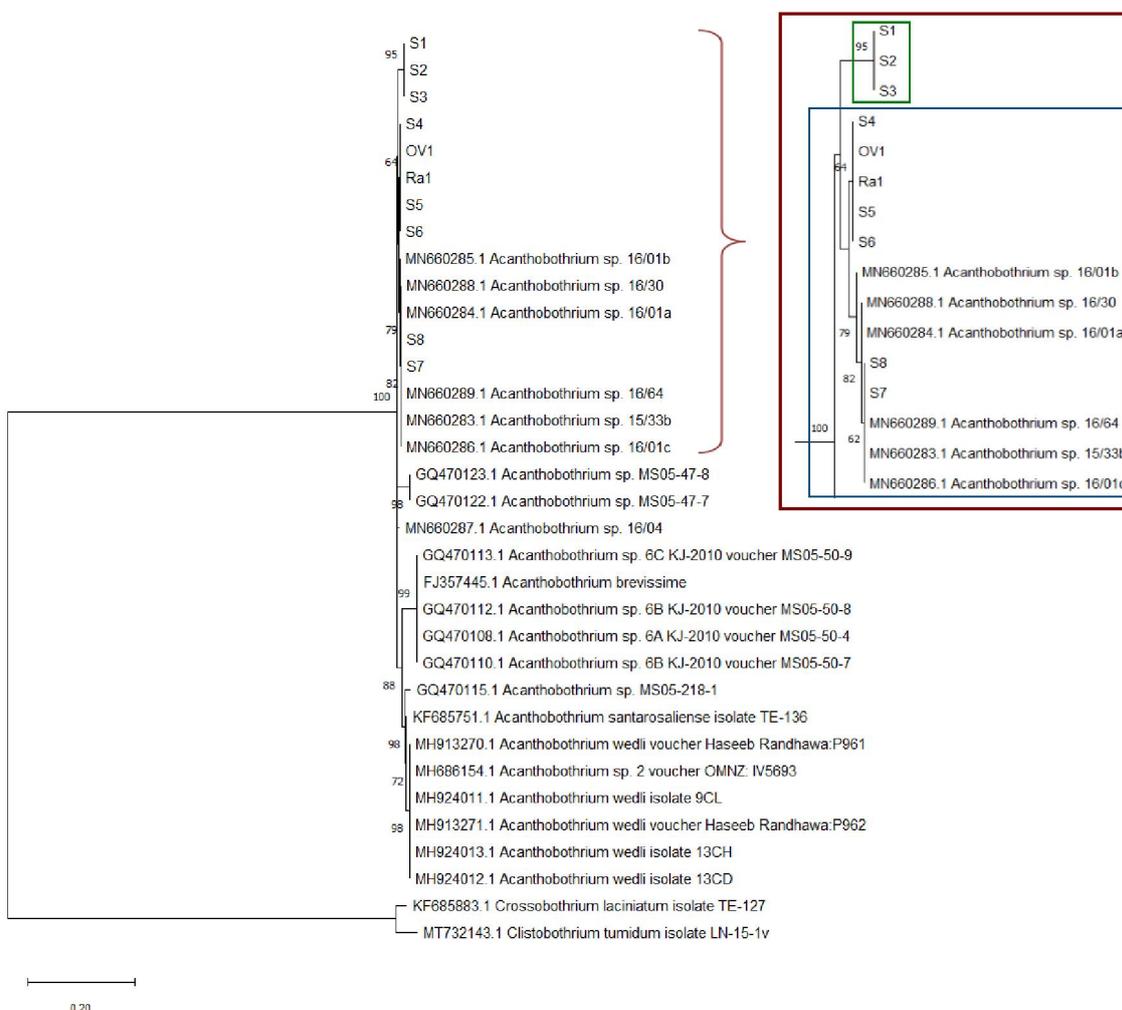


Figure 16. Arbre phylogénétique construit à partir des séquences D2 des cestodes récoltés chez *Sepia officinalis*, *Octopus vulgaris* et *Raja asterias* du littoral algérois ainsi que 24 séquences de Genbank. L'arbre est reconstruit par la méthode du Maximum likelihood. Le support nodal n'est considéré que pour les valeurs supérieures à 50%. L'encart est un agrandissement sur le clade regroupant nos séquences

Les 9 larves récoltées chez les céphalopodes et l'adulte obtenu de la raie, forment un clade monophylétique avec les mêmes 6 espèces d'*Acanthobothrium* sp citées plus haut (**Figure 16**).

Les relations entre les 3 différents sous-groupes formés par nos cestodes présentent une topographie différente de l'analyse phylogénétique réalisée avec le D1-D3 :

- le groupe constitué de S1, S2, S3, forme un clade à part (**Figure 16, encadré vert**).
- le groupe formé de S4, S5, S6, OV1, RA1 et celui formé par S7 et S8 sont intégrés dans un même clade (**Figure 16, encadré bleu**).

- S7 et S8 sont regroupés avec les cestodes *Acanthobothrium* sp. 16/64 (MN660289.1), *Acanthobothrium* sp. 15/33b (MN660283.1) et *Acanthobothrium* sp. 16/01c (MN660286.1) conservent les mêmes rapprochements phylogénétiques observés dans l'analyse du domaine D1-D3 (**Figure 16, encadré bleu**).

Ces résultats permettent d'affirmer la monophylie des 10 cestodes de notre étude avec les cestodes appartenant au genre *Acanthobothrium*. La robustesse de la topologie des clades regroupant les sous-groupes de cestodes de notre étude semblent valider nos résultats. En effet, le bootstrap est de 100% dans les deux analyses menées sur les domaines D1-D3 et D2.

IV. Discussion

Etant considérée parmi les ressources halieutiques majeures en Méditerranée et dans les eaux atlantiques, et vu son importance économique, la seiche *Sepia officinalis* a suscité l'intérêt des chercheurs. De nombreuses études ont traité différents aspects de sa biologie et de son écologie (voir la synthèse bibliographique). Cependant, la parasitologie de ce céphalopode et en particulier les cestodes, est très pauvrement documentée. Les quelques travaux menés dans ce domaine sont relativement anciens et se résument à des observations morphologiques dont la majeure partie a été faite par l'ichtyologiste R.P Dollfus. Ce chercheur a signalé la présence de larve de *Scolex pleuronectis unilocularis*, *Scolex pleuronectis bilocularis* et *Scolex polymorphus* chez la seiche *S. officinalis* en Méditerranée (Dollfus 1958, 1964). Il a également mentionné des larves nommées *Scolex pleuronectis bilocularis*, *Scolex pleuronectis trilocularis*, *Dinobothrium plicatum* Linton, 1922 et des larves correspondant à *Phyllobothrium lactuca* Van Beneden, 1850, hébergées principalement dans le tractus digestif d'individus pêchés en Atlantique. Toutes ces larves étaient considérées comme des espèces de Tetrphyllidea selon les règles taxinomiques admises à l'époque. Il est intéressant de noter qu'aucun stade adulte n'a été observé chez la seiche, seuls des stades larvaires de cestodes ont été signalés. Ceci peut être la principale cause de ce manque de documentation, car comme il a été précédemment mentionné, les stades larvaires des cestodes ne ressemblent pas à leurs adultes, ce qui entraîne de nombreuses confusions et erreurs dans l'identification.

Néanmoins, les méthodes moléculaires ont permis de surmonter cette contrainte. Jensen & Bullard (2010), dans leur étude sur les cestodes du golfe du Mexique, ont posé les fondations d'une approche qui associe biologie moléculaire et morphologie. Car si l'individu peut passer par différents phénotypes au cours de l'ontogenèse, son génome cependant ne change pas. Il est donc plus aisé de retrouver à travers une séquence d'ADN le lien commun entre le stade larvaire et l'adulte qui lui succède. Depuis cette étude, les travaux utilisant cette approche sur les cestodes des céphalopodes n'ont cessé d'augmenter mais aucune n'a abordée la parasitofaune de la seiche commune. A notre connaissance nos résultats sont donc les premiers qui considèrent l'aspect helminthologique de *S. officinalis* sur une base génétique.

L'analyse phylogénétique a dévoilé que nos 10 spécimens étudiés correspondaient au genre *Acanthobothrium* Blanchard, 1848. Ceci est observable à travers les résultats du BLAST qui sont résumés dans le **tableau VIII**. Ils montrent une similitude génétique élevée sur les domaines D1-D3 et D2 de l'ADNr 28S, entre nos cestodes et des plérocercoides appartenant à *Acanthobothrium* récoltées par Tedesco et al. (2020) chez *Octopus vulgaris* de la mer Méditerranée. Certaines de ces larves, *Acanthobothrium* sp. 16/64, *Acanthobothrium* sp. 16/01c, *Acanthobothrium* sp. 15/33b,

partagent même une identité génétique parfaite (100%) sur le domaine D2 avec le sous-groupe formé par les larves S7 et S8. Par ailleurs, les arbres phylogénétiques montrent d'une part la monophylie de tous ces cestodes qui se sont regroupés dans un même clade avec un support très robuste de 100%, confirmant ainsi ces résultats. Et d'autre part la dominance du genre *Acanthobothrium* dans les taxons représentés dans ces 2 arbres.

Malheureusement on ne peut déterminer l'espèce de ces *Acanthobothrium*. Il est fort probable que ces cestodes appartiennent à une espèce non répertoriée dans Genbank, car malgré que ce genre soit le plus diversifié des Onchoproteocephalidea (Caira & Jensen, 2017), avec plus de 201 espèces validées (Tedesco et al., 2020), il n'y a que 18 séquences répertoriées dans Genbank. De plus, de nouvelles espèces sont constamment découvertes (Franzese et Ivanov, 2020; Zaragoza-Tapia, Pulido-Flores, et Monks, 2020; Van Der Spuy et al., 2020; Gallagher et Caira, 2020). Il est par conséquent possible que les parasites de notre analyse appartiennent à une nouvelle espèce d'*Acanthobothrium*.

Acanthobothrium a un cycle de vie indirect et complexe, il peut parasiter entre 2 et 4 hôtes intermédiaires et/ou paraténiques avant d'atteindre son hôte définitif. Les adultes d'*Acanthobothrium* parasitent la valvule spirale de l'intestin des élasmobranches, mais les hôtes intermédiaires et paraténiques d'*Acanthobothrium* sont encore mal connus, et malgré que plusieurs études aient été réalisées sur ces parasites au fil des années, pas un seul cycle de vie n'a été élucidé.

Les résultats présentés dans ce travail, permettent une meilleure compréhension des cycles évolutifs d'*Acanthobothrium*. L'analyse moléculaire a montré une légère variabilité génétique entre les 10 individus de notre étude; il est ressorti qu'ils étaient répartis en 3 groupes, chacun divergeant légèrement des deux autres. Mais le plus grand écart de cette divergence génétique entre les 3 groupes est de 1,5%, donc cette divergence ne serait que le reflet d'une variabilité interspécifique.

Du fait que le groupe composé des 3 larves récoltées chez *S. officinalis* (S4, S5 et S6) et d'une larve chez *O. vulgaris* (OV 1) comporte également un adulte (Ra1), nous avons la preuve que cette espèce indéterminée d'*Acanthobothrium* utilise les 2 céphalopodes comme hôtes intermédiaires ou paraténiques et *Raja asterias* comme hôte définitif.

Ce dernier résultat contribue à accroître l'étendue des hôtes intermédiaires recensés dans la littérature et enrichit l'état des connaissances actuelles. Les cestodes parasitent plusieurs hôtes avant d'arriver à l'hôte final, de plus la même espèce d'*Acanthobothrium* peut parasiter plusieurs hôtes définitifs. En d'autres termes elle peut utiliser deux voies alternatives pour compléter son cycle évolutif.

Dans le but d'identifier le cycle de vie du cestode dans les eaux algéroises à partir de notre analyse moléculaire, nous nous sommes intéressés aux travaux réalisés sur *Acanthobothrium* ainsi qu'aux proies et prédateurs de *S. officinalis*, étant donné que la transmission des larves dans un cycle évolutif suit la chaîne trophique (Rohde, 2005).

Plusieurs espèces d'*Acanthobothrium* ont été signalées chez des élastrobranches de la mer Méditerranée (Caira et Jensen, 2017; Zaragoza-Tapia, Pulido-Flores, Gardner, et al., 2020). Nous avons recensé en tout 20 espèces d'*Acanthobothrium* et 18 espèces de raies et requins constituant leurs hôtes définitifs. Toutes ces espèces sont regroupées dans le **tableau XI**.

Tableau XI : Liste des espèces d'*Acanthobothrium* trouvés chez des élastrobranches en méditerranée

	Espèces	Hotes
1	<i>A. batailloni</i>	<i>Myliobatis aquila</i>
2	<i>A. benedeni</i>	<i>Raja clavata, Dasyatis violacea, Torpedo marmorata, Raja asterias</i>
3	<i>A. coronatum</i>	<i>Raja batis, Scyliorhinus stellaris, S. canicula, Mustelus mustelus, Dasyatis pastinaca, Torpedo marmorata, T. torpedo</i>
4	<i>A. crassicolle</i>	<i>Dasyatis pastinaca</i>
5	<i>A. dujardini</i>	<i>Raja clavata, Raja montagui, Raja brachyura</i>
6	<i>A. edwardsi</i>	<i>Leucoraja fullonica (Raja fullonica)</i>
7	<i>A. filicolle</i>	<i>Torpedo marmorata, Torpedo torpedo</i>
8	<i>A. incognita</i>	<i>Dasyatis pastinaca</i>
9	<i>A. intermedium</i>	<i>Dasyatis pastinaca</i>
10	<i>A. magnum</i>	<i>Pteroplatytrygon violacea (Dasyatis violacea)</i>
11	<i>A. mathiasi</i>	<i>Mustelus mustelus</i>
12	<i>A. minus</i>	<i>Raja asterias</i>
13	<i>A. musculosum</i>	<i>Pteroplatytrygon violacea (Dasyatis violacea)</i>
14	<i>A. ponticum</i>	<i>Raja clavata, Dasyatis pastinaca</i>
15	<i>A. quadripartitum</i>	<i>Leucoraja naevus (Raja naevus)</i>
16	<i>A. rajaebatis</i>	<i>Dipturus oxyrinchus (Raja batis), Raja alba</i>
17	<i>A. septentrionale</i>	<i>Raja batis</i>
18	<i>A. zschokkei</i>	<i>Torpedo torpedo (as Torpedo ocellata), Torpedo marmorata</i>
19	<i>A. australis</i>	<i>Squalus megalops</i>
20	<i>A. chengi</i>	<i>Bathytoshia lata (Dasyatis lata)</i>

De tous les hôtes cités dans ce tableau, 16 font partie de la faune ichthyologique de la côte algérienne (Refes et al., 2010). A partir des données connues sur la distribution bathymétrique et le régime alimentaire de ces élastrobranches, une liste des hôtes définitifs potentiels pouvant faire partie du cycle de vie des cestodes étudiés, a été établie (**Tableau XII**).

Tous ces élastrobranches sont des espèces côtières vivant entre la surface et des profondeurs variables d'une espèce à une autre, allant jusqu'à 800 m pour certaines (Séret, 2010).

Il a été démontré dans de nombreuses études que les céphalopodes font partie, avec les téléostéens et les crustacés, des proies préférentielles de toutes ces espèces. Des études basées sur l'analyse des contenus stomacaux des raies *Raja asterias*, *Raja clavata*, *Raja alba*, *Torpedo torpedo* et *Myliobatis aquila* ainsi que le requin *Scyliorhinus canucula*, pêchées dans les côtes tunisiennes, ont signalés *S. officinalis* comme étant proie ingérée de ces élastombranches (Azouz et Capapé, 1971; Christian, 1976; Capapé et Quignard, 1977; Kamel-Moutalibi et al., 2013; Kadri et al., 2014). *Mustelus mustelus*, *Scyliorhinus stellaris*, *Dasyatis violeacea* et *Dasyatis pastinaca* ont été classés parmi les prédateurs de la seiche commune dans d'autres travaux (Capape, 1975; Yeldan et al., 2009; Lipej et al., 2013; Jereb et al., 2015).

Pour les 6 autres raies restantes, peu d'études ont été réalisées sur leur régime alimentaire. Mais étant donné qu'ils s'alimentent préférentiellement d'espèces benthiques (Farias et al., 2006; Capapé et al., 2007; Ebert & Bizzarro, 2007; Mulas et al., 2015) et que *S. officinalis* a un mode de vie necto-benthique, ceci peut amener le recouvrement des niches écologiques de ces espèces. Et donc il est fort probable qu'elle fasse partie de leur régime alimentaire, mais le manque de données ne nous permet pas de le confirmer.

Tableau XII : Elasmobranches du littoral algérien pouvant constituer des hôtes définitifs pour *Acanthobothrium*

	Taxons	Espèces	Prédateur de <i>Sepia officinalis</i>	Références
Selachoidea	Carcharhiniformes			
	Triakidae	<i>Mustelus mustelus</i>	Oui	Jereb et al. (2015)
	Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus canucula</i> <i>Scyliorhinus stellaris</i>	Oui Oui	Azouz & Capapé (1971) Jereb et al. (2015)
Batoidea	Rajiformes Rajidae	<i>Raja asterias</i>	Oui	Capapé & Quignard (1977)
		<i>Raja clavata</i>	Oui	Kadri et al. (2014)
		<i>Raja mantagui</i>	Probable	/
		<i>Raja brachyura</i>	Probable	/
		<i>Raja fullonica</i>	Probable	/
		<i>Raja naevus</i>	Probable	/
		<i>Raja alba</i>	Oui	Azouz & Capapé (1971)
		<i>Raja batis</i>	Probable	/
	Torpediniformes Torpedinidae	<i>Torpedo torpedo</i>	Oui	Kamel-Moutalibi et al., (2013)
		<i>Torpedo marmorata</i>	Probable	/
	Myliobatiformes Dasyatidae Myliobatidae	<i>Dasyatis pastinaca</i>	Oui	Yeldan et al. (2009)
<i>Dasyatis violeacea</i>		Oui	Jereb et al (2015)	
<i>Myliobatis aquila</i>		Oui	Christian (1976)	

Il est important de noter qu'*Octopus vulgaris* a été trouvé dans l'estomac de *Raja asterias*, *Raja clavata*, *Raja batis*, *Dasyatis pastinaca* et *Mustelus mustelus* (Capapé et Quignard, 1977; Yeldan et al., 2009; Kadri et al., 2014; Jereb et al., 2015; Mulas et al., 2015) et qu'il est possible qu'il soit également une proie des autres espèces citées dans le **tableau XII**. Etant donné que le rôle de ce céphalopode dans la transmission du genre *Acanthobothrium* a été attestée par nos résultats, notre analyse phylogénétique nous permet de suggérer fortement que *Sepia officinalis* et *Octopus vulgaris* constituent des hôtes intermédiaires dans le cycle évolutif de ce cestode. L'une des 20 espèces du **tableau XI** constitue un candidat potentiel pour l'espèce non identifiée de notre analyse.

La seiche *S. officinalis* est une opportuniste qui chasse les proies les plus disponibles dans son environnement immédiat, elle se nourrit des crustacés et des petits poissons osseux qui sont ses proies préférentielles, mais aussi des mollusques bivalves, gastéropodes et même des céphalopodes. Il se trouve que ces créatures marines font aussi partie du régime alimentaire du poulpe commun *Octopus vulgaris* (Ambrose & Nelson, 1983; Guerra & Nixon, 1987; Jereb et al., 2015). Il se pourrait donc que ces proies jouent le rôle de vecteurs de transmission pour les larves de notre *Acanthobothrium* chez les 2 céphalopodes.

Le **tableau XIII** regroupe quelques espèces de proies signalées en Méditerranée (Azouz & Capapé, 1971; Ambrose & Nelson, 1983), partagés entre *S. officinalis* et *O. vulgaris*, chez qui des cestodes ont été observés.

Tableau XIII : Espèces proies communes entre *Sepia officinalis* et *Octopus vulgaris*, chez lesquels des larves de cestodes ont été observés.

Taxon	Espèces proies	Cestodes observés	Références
Osteichthyes Teleostei	29 espèces indéterminées	<i>Scolex polymorphus</i>	Dollfus (1923)
Crustacea Amphipoda Decapoda	<i>Gammarus locusta</i>	<i>Scolex polymorphus</i>	Dollfus (1964)
	<i>Carcinus maenas</i>	Onchobothriidae	Dollfus (1923)
	<i>Maja squinado</i>	Onchobothriidae	Vivares (1971) Dollfus (1974)
	<i>Liocarcinus vernalis</i>	Onchobothriidae	Vivares (1971)
	<i>Macropipus tuberculatus</i>	Onchobothriidae	Vivares (1971)

Etant donné que les élaémobranches se nourrissent aussi de crustacés et de poissons, il n'est pas exclu que toutes les espèces citées ici soit parmi leurs proies. Il se trouve qu'une analyse des contenus stomacaux de *Raja clavata* a révélé la présence de *Maja squinado* (Kadri et al., 2014).

D'autres analyses ont également retrouvées 2 de ces crustacés chez les hôtes définitifs potentiels cités en haut : *Dorippe lanata* est retrouvé chez *Raja asterias* (Capapé et Quignard, 1977), *Raja clavata*, *Dasyatis pastinaca* et *Myliobatis aquila* qui contenait aussi *Macropipus tuberculatus* retrouvée également chez *Raja batis* (Azouz et Capapé, 1971). Ces observations indiquent que les poissons téléostéens et les Crustacés décapodes et amphipodes sont sans doute les premiers hôtes intermédiaire d'*Acanthobothrium*.

A travers tous ces résultats, il est possible de proposer un cycle évolutif pour *Acanthobothrium* trouvé chez *S. officinalis* du littoral algérien, d'après le scénario suivant :

L'adulte hermaphrodite parasitant l'intestin spiral d'un élasmobranche (Carcharhiniformes, Rajiformes, Torpediniformes ou Myliobatiformes) produit des œufs qui sont excrétés avec les déjections de l'hôte dans la mer. Les œufs contenant une larve hexacanthé sont ingérés par un premier hôte intermédiaire, un crustacé (amphipode, décapode) ou un poisson téléostéen, chez qui elle évolue en larve procercoïde. Ensuite cet hôte est consommé, et la larve est de ce fait transférée vers le consommateur. A partir de ce point, 2 scénarios sont possibles : le prédateur du crustacé/poisson infecté peut être soit l'un des 2 céphalopodes (*Sepia officinalis* ou *Octopus vulgaris*) qui devient le deuxième hôte intermédiaire chez lequel la larve procercoïde se développe en larve pléroceroïde (**Figures 17**), soit un autre crustacé/poisson. Dans ce cas, ce dernier devient le deuxième hôte intermédiaire qui procure à la larve procercoïde l'environnement approprié pour laquelle se développe en larve pléroceroïde. Le céphalopode ici intervient comme hôte paraténique en ingérant le deuxième hôte intermédiaire (**Figures 18**). La larve complétera son développement vers le stade adulte, lorsque le dernier hôte intermédiaire ou paraténique aura été la proie de l'élasmobranche hôte définitif.

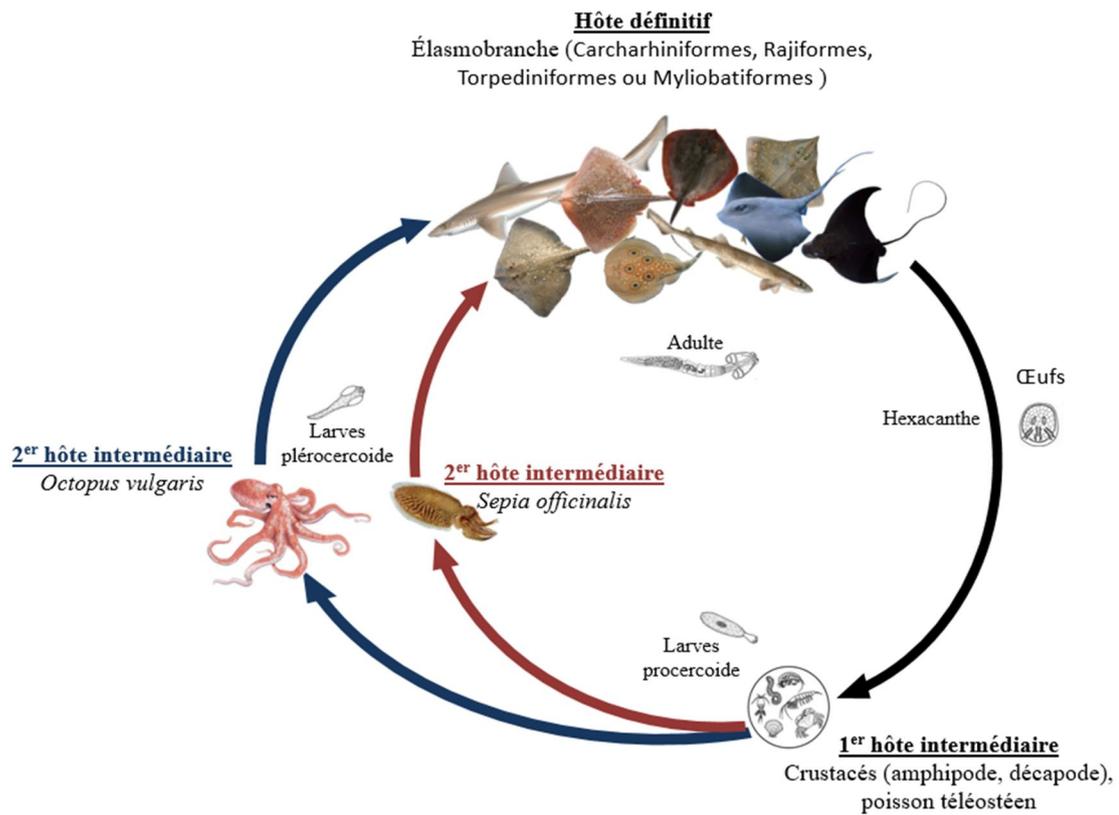


Figure 17. Proposition de cycle évolutif pour *Acanthobothrium* sp. dans les eaux algériennes

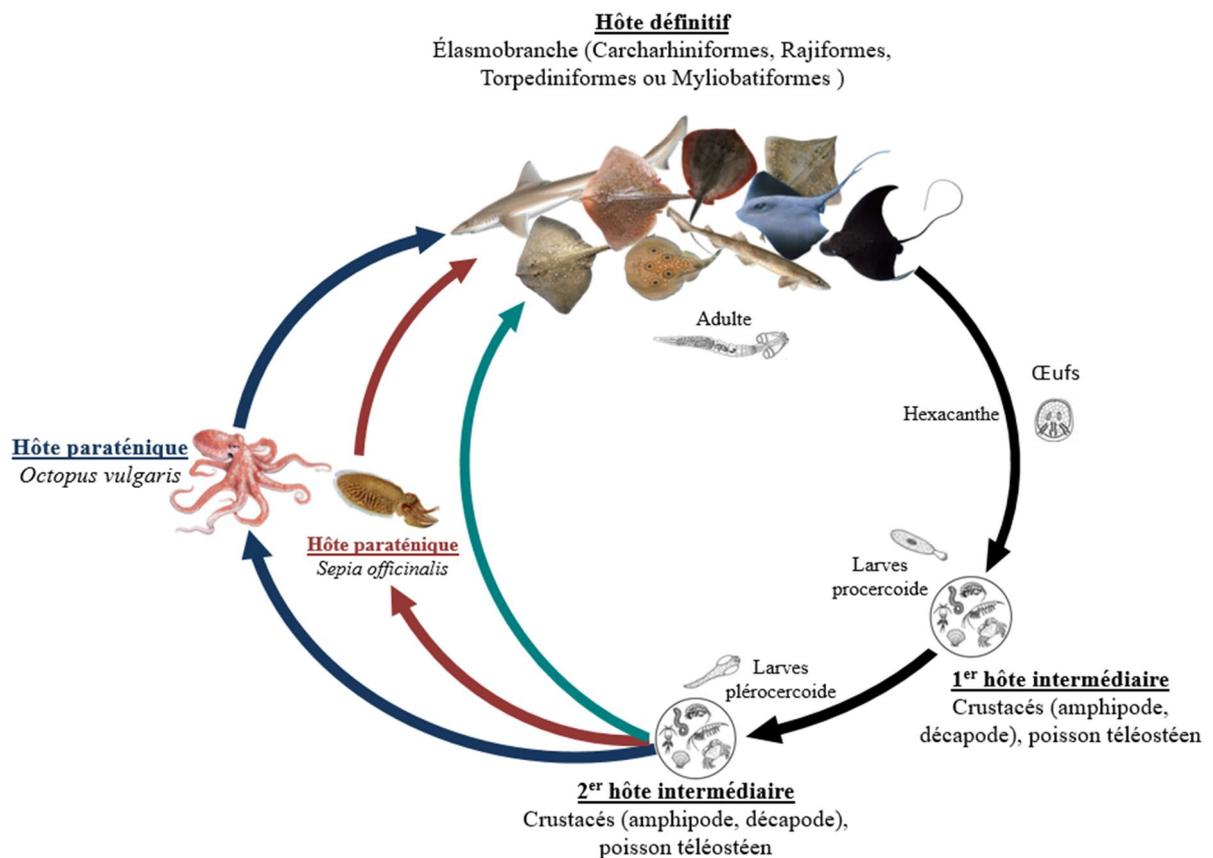


Figure 18. Proposition de cycle évolutif pour *Acanthobothrium* sp. dans les eaux algériennes

Conclusion

Dans la présente étude, nous avons réalisé une analyse phylogénétique des cestodes parasitant la seiche commune *Sepia officinalis* du littoral algérois. L'identification de ces parasites et la reconstruction de leur phylogénie ont été réalisées grâce à une analyse moléculaire des marqueurs D1-D3 du gène 28S largement utilisé dans la phylogénie des cestodes.

La comparaison et l'alignement des séquences des 10 cestodes qui ont servi à cette étude avec celles obtenu à partir de Genbank nous ont permis d'étudier la diversité génétique entre eux.

Nos spécimens partageaient une identité génétique élevée avec des larves pléroceroïdes du cestode Onchoproteocephalidea *Acanthobothrium* sp. parasitant le poulpe *Octopus vulgaris* de la mer Méditerranée. Cette similitude génétique élevée, combinée aux résultats de l'analyse phylogénétique a permis d'assigner nos parasites au genre *Acanthobothrium*. C'est pour la première fois que ce dernier est identifié chez *Sepia officinalis*, et cela grâce aux marqueurs moléculaires utilisés.

Dans l'échantillon de cette étude, un individu correspondait à un adulte *Acanthobothrium* sp. provenant de l'intestin d'une raie *Raja asterias*. Ce résultat nous a permis de mettre en évidence la contribution de *Sepia officinalis* et d'*Octopus vulgaris* dans la transmission des larves du genre *Acanthobothrium* infectant les élasmobranches, en particulier *Raja asterias*.

A la lumière de nos résultats, nous avons proposé 20 espèces potentielles pouvant figurer les larves d'*Acanthobothrium* non identifiées spécifiquement.

Le présent travail est le premier qui considère l'aspect helminthologique de *S. officinalis* sur une base génétique et contribue à une meilleure compréhension des cycles évolutifs du cestode *Acanthobothrium* dans les eaux du littoral algérois. Cependant, nous n'avons pas pu identifier les 10 cestodes au niveau de l'espèce par manque de données moléculaires dans Genbank.

Un travail plus approfondi, basé sur un échantillonnage plus important de seiches *Sepia officinalis* et d'élasmobranches, un élargissement des marqueurs moléculaires pour l'analyse phylogénétique et moléculaire, pourrait confirmer ces résultats, et contribuer à enrichir les bases de données moléculaires encore insuffisante à ce jour.

De telles études pourraient être utilisées non seulement pour une étude sanitaire des ressources halieutiques des côtes algériennes, une meilleure connaissance de la biodiversité de la parasitofaune, des relations trophiques dans le milieu marin et l'élucidation des cycles évolutifs des cestodes largement inconnus.

Références bibliographiques

- Ambrose, R. F., & Nelson, B. V. (1983). Predation by *Octopus vulgaris* in the Mediterranean. *Marine Ecology*, 4(3), 251-261. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1983.tb00299.x>
- Amit Roy, S. R. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
- Azouz, A., & Capapé, C. (1971). *Les relations alimentaires entre les selaciens et le zoobenthos des cotes Nord de la Tunisie*. <https://aquadocs.org/handle/1834/8541>
- Bennett, J., Jorge, F., Poulin, R., & Randhawa, H. (2019). Revealing trophic transmission pathways of marine tapeworms. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06264-3>
- Brickle, P., Olson, P. D., Littlewood, D. T. J., Bishop, A., & Arkhipkin, A. I. (2001). Parasites of *Loligo gahi* from waters off the Falkland Islands, with a phylogenetically based identification of their cestode larvae. *Canadian Journal of Zoology*, 79(12), 2289-2296. <https://doi.org/10.1139/z01-189>
- Caira, J. N., Bueno, V., & Jensen, K. (2021). Emerging global novelty in phyllobothriidean tapeworms (Cestoda : Phyllobothriidea) from sharks and skates (Elasmobranchii). *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlaa185. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlaa185>
- Caira, J. N., & Jensen, K. (2014). A Digest of Elasmobranch Tapeworms. *Journal of Parasitology*, 100(4), 373-391. <https://doi.org/10.1645/14-516.1>
- Caira, J. N., & Jensen, K. (2017). *Planetary Biodiversity Inventory (2008–2017) : Tapeworms from Vertebrate Bowels of the Earth*. Natural History Museum, University of Kansas. <https://kuscholarworks.ku.edu/handle/1808/24421>
- Caira, J. N., Jensen, K., Pickering, M., Ruhnke, T. R., & Gallagher, K. A. (2020). Intrigue surrounding the life-cycles of species of *Clistobothrium* (Cestoda : Phyllobothriidea)

- parasitising large pelagic sharks. *International Journal for Parasitology*, 50(13), 1043-1055. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.08.002>
- Caira, J. N., Jensen, K., Waeschenbach, A., Olson, P. D., & Littlewood, D. T. J. (2014). Orders out of chaos – molecular phylogenetics reveals the complexity of shark and stingray tapeworm relationships. *International Journal for Parasitology*, 44(1), 55-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.10.004>
- Capape, C. (1975). Observations sur le régime alimentaire de 29 sélaciens pleurotrèmes des côtes tunisiennes. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TN19780252183>
- Capapé, C., Crouzet, S., Clément, C., Vergne, Y., & Guélorget, O. (2007). *Diet of the marbled electric ray *Torpedo marmorata* (Chondrichthyes : Torpedinidae) off the languedocian coast (southern France, northern Mediterranean)*. 1(17), 17-22.
- Capapé, C., & Quignard, J. P. (1977). *Contribution à la biologie des Rajidae des côtes tunisiennes 6. Raja asterias Delaroche, 1809 Régime alimentaire*. 319-332.
- Castro, B., & Guerra, A. (1990). *The diet of *Sepia officinalis* and *Sepia elegans* (Cephalopoda, Sepioidea) from the Ría de Vigo (NW Spain)*. 54, 375-388.
- Christian, C. (1976). Etude du régime alimentaire de l'Aigle de mer, *Myliobatis aquila* (L., 1758) des côtes tunisiennes. *ICES Journal of Marine Science*, 37(1), 29-35. <https://doi.org/10.1093/icesjms/37.1.29>
- Darlu, P., & Tassy, P. (2004). *La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes*. <https://www.decitre.fr/livres/la-reconstruction-phylogenetique-9782373611724.html>
- Dollfus, R.-Ph. (1923). Énumération des cestodes du plancton et des invertébrés marins. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1(4), 363-394. <https://doi.org/10.1051/parasite/1923014363>

- Dollfus, R.-Ph. (1958). *Copépodes, isopodes et helminthes parasites des céphalopodes de la Méditerranée et de l'Atlantique européen*. (Observatoire océanologique, Éd.). Université de Paris, Laboratoire Arago.
- Dollfus, R.-Ph. (1964). Énumération des Cestodes du plancton et des Invertébrés marins : (6e Contribution). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 39(3), 329-379.
<https://doi.org/10.1051/parasite/1964393329>
- Dollfus, R.-Ph. (1974). Énumération des Cestodes du plancton et des Invertébrés marins 8e Contribution. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 49(4), 381-410.
<https://doi.org/10.1051/parasite/1974494381>
- Ebert, D. A., & Bizzarro, J. J. (2007). Standardized diet compositions and trophic levels of skates (Chondrichthyes : Rajiformes: Rajoidei). *Environmental Biology of Fishes*, 80(2-3), 221-237. <https://doi.org/10.1007/s10641-007-9227-4>
- FAO. (2021). *Fiches d'information sur les espèces—Sepia officinalis (Linnaeus, 1758)*.
<http://www.fao.org/fishery/species/2711/en>
- Farias, I., Figueiredo, I., Moura, T., Serrano Gordo, L., Neves, A., & Serra-Pereira, B. (2006). Diet comparison of four ray species (*Raja clavata*, *Raja brachyura*, *Raja montagui* and *Leucoraja naevus*) caught along the Portuguese continental shelf. *Aquatic Living Resources*, 19(2), 105-114. <https://doi.org/10.1051/alr:2006010>
- Franzese, S., & Ivanov, V. A. (2020). Two new species of *Acanthobothrium* Blanchard, 1848 (Cestoda : Onchoproteocephalidea) from rajiform batoids off Argentina. *Folia Parasitologica*, 67. <https://doi.org/10.14411/fp.2020.016>
- Gallagher, K. A., & Caira, J. N. (2020). A New Species of *Acanthobothrium* (Cestoda : Onchoproteocephalidea) from the Smalleye Pygmy Shark, *Squaliolus aliae* (Chondrichthyes: Squaliformes: Dalatiidae), from Taiwan. *Journal of Parasitology*, 106(6). <https://doi.org/10.1645/20-15>

Guardone, L., Giusti, A., Bilska-Zajac, E., Malandra, R., Rózycki, M., & Armani, A. (2020).

Molecular Characterization of *Clistobothrium* sp. Viable Plerocercoids in Fresh Longfin Inshore Squid (*Doryteuthis pealeii*) and Implications for Cephalopod Inspection.

Pathogens, 9(7), 596. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070596>

Guégan, J., Renaud, F., & Thomas, F. (2012). *Écologie et évolution des systèmes parasités* (2e édition).

Guerra, A., & Nixon, M. (1987). Crab and mollusc shell drilling by *Octopus vulgaris* (Mollusca : Cephalopoda) in the Ria de Vigo (north-west Spain). *Journal of Zoology*, 211(3), 515-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1987.tb01549.x>

Hanlon, R., Vecchione, M., & Allcock, L. (2018). *Octopus, Squid, and Cuttlefish*. University of Chicago Press.

Holland, N. D., & Wilson, N. G. (2009). Molecular Identification of Larvae of a Tetracystid Tapeworm (Platyhelminthes : Eucestoda) in a Razor Clam as an Alternative Intermediate Host in the Life Cycle of *Acanthobothrium brevissime*. *Journal of Parasitology*, 95(5), 1215-1217. <https://doi.org/10.1645/GE-1946.1>

Jensen, K., & Bullard, S. A. (2010). Characterization of a diversity of tetracystid and rhinebothriid cestode larval types, with comments on host associations and life-cycles. *International Journal for Parasitology*, 40(8), 889-910. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.015>

Jereb, P., Allcock, A. L., Lefkaditou, E., Piatkowski, U., Hastie, L. C., & Pierce, G. J. (2015).

Cephalopod biology and fisheries in Europe : II. Species Accounts. International Council for the Exploration of the Sea.

<https://abdn.pure.elsevier.com/en/publications/cephalopod-biology-and-fisheries-in-europe-ii-species-accounts>

- Jereb, P., & Roper, Clyde F. (2005). *Cephalopods of the World : Chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae, and Spirulidae)* (Vol. 3). Food & Agriculture Org.
- Kadri, H., Marouani, S., Bradai, M. N., & Bouaïn, A. (2014). Diet and feeding strategy of thornback ray, *Raja clavata* (Chondrichthyes : Rajidae) from the Gulf of Gabes (Tunisia—Central Mediterranean Sea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94(7), 1509-1516. <https://doi.org/10.1017/S0025315414000587>
- Kamel-Moutalibi, O., Mnasri, N., Boumaïza, M., Reynaud, C., & Capapé, C. (2013). Diet of common torpedo *Torpedo torpedo* (Chondrichthyes : Torpedinidae) from the Lagoon of Bizerte (northeastern Tunisia, central Mediterranean). *undefined*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Diet-of-common-torpedo-Torpedo-torpedo-from-the-of-Kamel-Moutalibi-Mnasri/793afaff9e93c77783b9a056a6f28de4f6d73fc9>
- Kennouche, H. (2017). *Céphalopodes de la côte algérienne. Biologie, écologie et exploitation de la seiche commune Sepia officinalis dans la région algéroise*.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28056.93445>
- Kinne, O. (1980). *Diseases of Marine Animals : Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata*. J. Wiley.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A.-M. (2009). *The Phylogenetic Handbook : A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* (2e édition). Cambridge University Press.
- Lipej, L., Mavrič, B., Paliska, D., & Capapé, C. (2013). Feeding habits of the pelagic stingray *Pteroplatytrygon violacea* (Chondrichthyes : Dasyatidae) in the Adriatic Sea. *Journal of*

- the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(2), 285-290.
<https://doi.org/10.1017/S0025315412000197>
- McGinnis, S., & Madden, T. L. (2004). BLAST : At the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server), W20-W25.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
- Mulas, A., Bellodi, A., Cannas, R., Cau, Al., Cuccu, D., Marongiu, M. F., Porcu, C., & Follesa, M. C. (2015). Diet and feeding behaviour of longnosed skate *Dipturus oxyrinchus* : *Dipturus oxyrinchus* feeding behaviour. *Journal of Fish Biology*, 86(1), 121-138.
<https://doi.org/10.1111/jfb.12551>
- Olson, P. D., Littlewood, D. T. J., Bray, R. A., & Mariaux, J. (2001). Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes : Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3), 443-467. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0930>
- Pascual, S., Gestal, C., Estévez, J. M., Rodríguez, H., Soto, M., Abollo, E., & Arias, C. (1996). Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain : An updated perspective. *Aquaculture*, 142(1-2), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)01254-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(96)01254-9)
- Petrić, M., Mladineo, I., & Šifner, S. K. (2011). Insight into the Short-Finned Squid *Illex coindetii* (Cephalopoda : Ommastrephidae) Feeding Ecology: Is There a Link Between Helminth Parasites and Food Composition? *Journal of Parasitology*, 97(1), 55-62.
<https://doi.org/10.1645/GE-2562.1>
- Randhawa, H., & Brickle, P. (2011). Larval parasite gene sequence data reveal cryptic trophic links in life cycles of porbeagle shark tapeworms. *Marine Ecology Progress Series*, 431, 215-222. <https://doi.org/10.3354/meps09108>
- Randhawa, H. S. (2011). Insights Using a Molecular Approach Into the Life Cycle of a Tapeworm Infecting Great White Sharks. *Journal of Parasitology*, 97(2), 275-280.
<https://doi.org/10.1645/GE-2530.1>

- Roumbedakis, K., Drábková, M., Tyml, T., & di Cristo, C. (2018). A Perspective Around Cephalopods and Their Parasites, and Suggestions on How to Increase Knowledge in the Field. *Frontiers in Physiology*, *9*, 1573. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01573>
- Samarasinghe, O. G., Jathunarachchi, J. A. C. G., Jeewanthi, H. M. D., Meedeniya, D. A., & Rajapaksa, S. P. (2019). Rule-Based Recommendation System for Phylogenetic Inference. *2019 Moratuwa Engineering Research Conference (MERCOn)*, 704-709. <https://doi.org/10.1109/MERCOn.2019.8818878>
- Sanchez, G., Setiamarga, D. H. E., Tuanapaya, S., Tongtherm, K., Winkelmann, I. E., Schmidbaur, H., Umino, T., Albertin, C., Allcock, L., Perales-Raya, C., Gleadall, I., Strugnell, J. M., Simakov, O., & Nabhitabhata, J. (2018). Genus-level phylogeny of cephalopods using molecular markers : Current status and problematic areas. *PeerJ*, *6*, e4331. <https://doi.org/10.7717/peerj.4331>
- Schickele, A., Francour, P., & Raybaud, V. (2021). European cephalopods distribution under climate-change scenarios. *Scientific Reports*, *11*(1), 3930. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83457-w>
- Seraphin, J., Drerup, C., & Cooke, G. (2019). *GUIDE D'IDENTIFICATION DE CEPHALOPODES DANS LA MER MEDITERANEE*.
- Séret, B. (2010). *Guide des requins des raies et des chimères de pêches françaises*. Direction de la pêche maritime et de l'aquaculture, IRD Paris.
- Sleator, R. D. (2011). Phylogenetics. *Archives of Microbiology*, *193*(4), 235-239. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0677-x>
- Tedesco, P., Caffara, M., Gustinelli, A., Fiorito, G., & Fioravanti, M. L. (2020). Metacestodes of Elasmobranch Tapeworms in *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from Central Mediterranean-SEM and Molecular Data. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/ani10112038>

- Van Der Spuy, L., Smit, N. J., & Schaeffner, B. C. (2020). Four new species of *Acanthobothrium* van Beneden, 1849 (Cestoda : Onchoproteocephalidea) from the spotted skate, *Raja straeleni* Poll, off the Western Cape, South Africa. *Folia Parasitologica*, 67. <https://doi.org/10.14411/fp.2020.036>
- Vivares, C. P. (1971). Etude des parasites des Crustacés Décapodes Brachyours : Némertes et larves de Cestodes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 46(1), 1-9. <https://doi.org/10.1051/parasite/1971461001>
- Ward, P. D., & Boletzky, S. V. (1984). Shell implosion depth and implosion morphologies in three species of *Sepia* (Cephalopoda) from the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 64(4), 955-966. <https://doi.org/10.1017/S0025315400047366>
- Yeldan, H., Avsar, D., & Manaşırlı, M. (2009). Age, growth and feeding of the common stingray (*Dasyatis pastinaca*, L., 1758) in the Cilician coastal basin, northeastern Mediterranean Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 25, 98-102. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01075.x>
- Zaragoza-Tapia, F., Pulido-Flores, G., Gardner, S. L., & Monks, S. (2020). Host relationships and geographic distribution of species of *Acanthobothrium* Blanchard, 1848 (Onchoproteocephalidea, Onchobothriidae) in elasmobranchs : A metadata analysis. *ZooKeys*, 940, 1-49. <https://doi.org/10.3897/zookeys.940.46352>
- Zaragoza-Tapia, F., Pulido-Flores, G., & Monks, S. (2020). Three new species of *Acanthobothrium* Blanchard, 1848 (Cestoda:Onchoproteocephalidea) in Stingrays (Dasyatidae) from the Pacific coast in Mexico. *Zootaxa*, 4766(1), 157-172. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4766.1.8>

Annexe 1 : protocole suivi pour l'obtention des séquences utilisés dans l'étude présente

- Prélèvement des parasites.
- Extraction d'ADN génomique grâce au kit QIAamp® DNA Micro Kit (KIAGEN, Allemagne) en suivant les instructions de fabricant.
- Amplification des marqueurs moléculaires D1-D3 et D2 (régions englobées dans le gène de l'ADNr 28S) par réaction de PCR en utilisant le kit GoTaq DNA polymérase (Promega), les amorces LSU5 et 1200R (**Figure 19**), un thermocycleur (PTC 100, Bio-Rad). Ceci sous les conditions suivantes : 2 min 30 s de dénaturation à 96°C ; 40 cycles de 30 s à 96°C, 20 s à 62°C, et 40 s à 72°C suivis par une étape de polymérisation à 72°C pendant 90 secondes.
- séparation des produits de PCR sur gel d'agarose à 1,5 %
- Estimation des concentrations d'ADN au marqueur de taille 100pb DNA ladder (Promega).
- purification des produits en utilisant le kit Wizard SV Gel& PCR Clean-Up System (Promega) selon les instructions du fournisseur.
- séquençage réalisé avec le kit GenomeLab DTCS-Quick Start (Beckman Coulter) et les amorces externes LSU5 et 1200R, internes ECD2 et 300F amplifiant la partie centrale du domaine D1-D3 couvrant la région variable D2 (**Tableau XIV**) par la technique de Dye Terminator qui est une adaptation de la technique de Sanger (Sanger et *al.*, 1977), à l'aide d'un séquenceur automatique Ceq 8000 (Beckman Coulter).
- Assemblage et correction des séquences contiguës à l'aide de logiciel Sequencher 4,5 TM (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, Etats-Unis). Les régions sans chevauchement situées en amont et en aval de la séquence ont été retirées avant l'analyse.

Tableau XIV : amorces utilisées pour les PCR avec indication du sens de la séquence et la référence

Amorces	Séquence 5'-3'	Direction	Référence
LSU5	5' TAGGTCGACCCGCTGAAYTTAAGC- 3'	Forward	Littlewood et <i>al.</i> , 2000
1200R	5' GCATAGTTCACCATCTTTCGG- 3'	Reverse	
300F	5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTT- 3'	Forward	
ECD2	5'-CTTGGTCCGTGTTTCAAAGACGGG- 3'	Reverse	

Le domaine D1-D3 amplifié et séquencé est représenté ci-après (**Figure 19**).

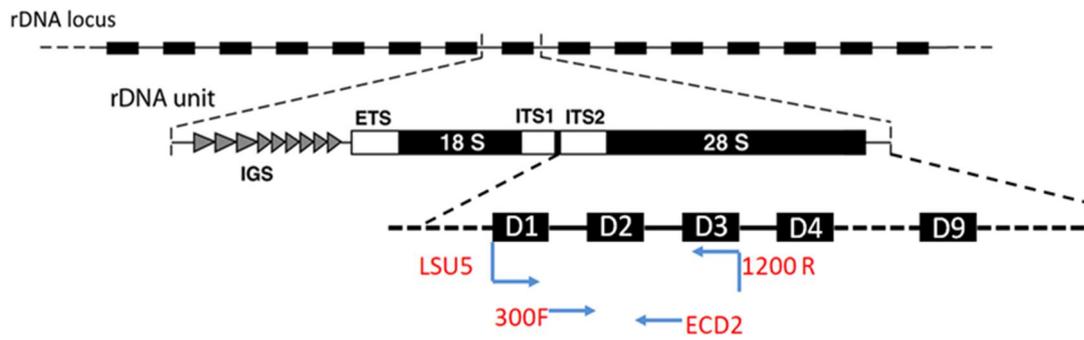


Figure 19 : Organisation générale des gènes ribosomiaux sur l'ADN eucaryote et représentation de l'emplacement du domaine D1-D3. Les amorces externes sont LSU 5 et 1200R et les amorces internes sont 300F et ECD2 (Benyahia, communication personnelle).